Proliferationskinetik von Tumorzellen und ihre Beeinflussung durch Zytostatika

Autoradiographische Untersuchungen mit H^3-Thymidin an Primärkulturen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Andreas K.J. Brachetti

Saarbrücken

1970

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus der Frauenklinik der Universität des Saarlandes

Direktor: Professor Dr. med. H. Limburg

PROLIFERATIONSKINETIK VON TUMORZELLEN UND IHRE BEEINFLUSSUNG DURCH ZYTOSTATIKA.

Autoradiographische Untersuchungen mit H^3-Thymidin an Primärkulturen.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Andreas K. J. Brachetti

Dekan: Prof. Dr. G. Dhom

Referent: Prof. Dr. H. Limburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung 8.7.1970

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Wachstumskriterien der Tumorzelle 4

1. Der Zellzyklus der Einzelzelle 4

2. Der Zellzyklus des Gewebeverbandes 9

3. Angriffspunkte der einzelnen Zytostatika im Ablauf des Zellzyklus 10

B. Proliferationskinetik von Tumorzellen und ihre Beeinflussung durch Zytostatika 14

I. Material und Methode 15

1. Untersuchte Gewebearten 15

2. Methoden der Kultivierung 15

3. Thymidininkorporation 18

4. Parameter zur Bestimmung der Tumorzellproliferation 21

5. Autoradiographie und Zytostatikatest 23

6. Methodenkritik 24

II. Die Proliferation der Tumorgewebe und ihre Beeinflussung durch Zytostatika 28

1. Proliferationsverhalten der Tumorzellen ... 29

2. Wirkung von Zytostatika auf die Proliferation 42

3. Zellmorphologie und DNS-Synthese 46

4. Besondere Beobachtungen 49

Seite

III. Diskussion der Ergebnisse 54

C. Zusammenfassung 75

D. Literaturverzeichnis 77

A. Wachstumskriterien der Tumorzelle.

Beim gesunden erwachsenen Menschen stehen Zellneubildung und Zelluntergang in einem dynamischen Fließgleichgewicht; dieses ist bei einem Tumorwachstum gestört. Für eine solche Störung werden folgende Mechanismen diskutiert:

1. Erhöhte Zellneubildung bei normalem Abbau oder aber
2. eine normale Neubildung bei verzögertem oder gehemmtem Abbau (66, 92).

Die Frage, ob es sich bei einer malignen Neoplasie um einen Wachstumsprozeß handelt, der durch einen zu raschen Zellumsatz oder durch einen gehemmten Abbau bedingt ist, hat erhebliche Konsequenzen für Prognose und Therapie. Bei einem schnellen Zellumsatz würden alle Mittel erfolgversprechend sein, die vorwiegend antimitotisch oder gegen die Synthese von Nukleinsäuren gerichtet sind. Bei verzögertem Abbau müßten dagegen diese Mittel erfolglos sein und das normale Gewebe mehr schädigen als das neoplastisch veränderte.

1. Der Zellzyklus der Einzelzelle.

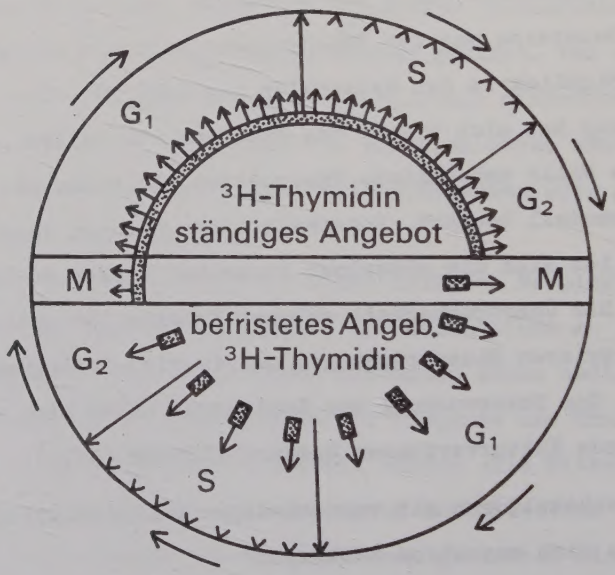
Zur genauen Charakteristik und Analyse des Tumorwachstums ist es zunächst notwendig, den zeitlichen Ablauf des Zellzyklus bei der Einzelzelle, der kleinsten Einheit des Tumors, zu beobachten. Über Dauer und Ablauf der Mitose gibt es übereinstimmende Ansichten bei einer Reihe von Unter-

suchern. Die Kenntnisse über die Verdopplungsvorgänge am Chromatin sowie über den Zeitpunkt und die Dauer der Verdopplungsphase werden jedoch zum Teil noch unterschiedlich beurteilt. Durch die Anwendung radioaktiv markierter Bausteine aus der DNS-Synthese wird ein differenzierter Einblick in den Zellzyklus möglich. Für diese Untersuchung hat sich bisher die Züchtung von Zellen, in unserem Falle menschliche Tumorzellen, in vitro als Versuchsmodell bewährt. Innerhalb eines solchen Versuchsmodelles sind die einzelnen Parameter besser zu beurteilen. Die Übertragbarkeit solcher Modelle ist jedoch nur mit gewissen Einschränkungen auf in vivo-Bedingungen möglich. Zur Untersuchung des Zellzyklus haben sich bisher folgende Kulturverfahren bewährt (LETTRÉ (54)):

1. Gewebekulturen mit verschiedenen Zellpopulationen, die sich asynchron teilen,
2. synchron wachsende Zellstämme.

Bei diesen Versuchsbedingungen besteht die Möglichkeit, das zur DNS-Synthese notwendige Thymidin in radioaktiver Form langfristig oder kurzfristig zu inkubieren.

Schema 1 (nach R. LETTRÉ)

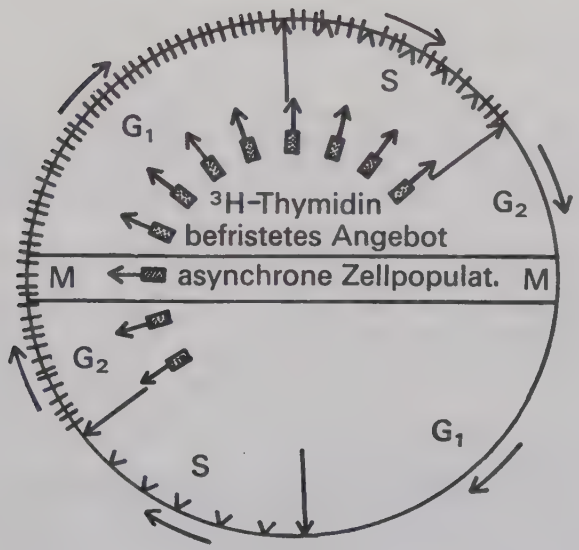


Schema I:

G_1 = Wachstums-(growth-) Phase 1
S = Synthese der DNS-Phase
G_2 = Wachstums-(growth-) Phase 2
M = Mitose

Es besteht eine große Variabilität der Dauer der verschiedenen Phasen von Spezies zu Spezies und von Zellart zu Zellart, ebenso ist die Dauer abhängig von den Milieubedingungen.

Schema 2 (nach R. LETTRÉ)



Schema IV:

Zahlen $\frac{I^*}{I}$ = Dauer $\frac{S}{G_2 + M + G_1}$

Werte der markierten Interphasen bleiben konstant bis zum Auftreten der ersten markierten Mitose

50 % M^* = Dauer G_2

Beginn der Mitosemarkierung

50 % M^* = Dauer $G_2 + S$

Aufhören der Mitosemarkierung

% Mitosen = Dauer $\frac{M}{G_2 + M + G_1 + S}$

Innerhalb des Zellzyklus lassen sich folgende Phasen unterscheiden (Schema 1 und 2):

1. Die Interphase, d.h. die Zeit zwischen zwei Teilungen,
2. die Zellteilung selbst (Mitose).

Innerhalb der Interphase unterscheidet man zwischen einer G_1-Phase (growth-Wachstum), einer Synthese-(S)-Phase und der G_2-Phase. Während der G_1-Phase bleibt die DNS-Menge konstant, RNS wird synthetisiert. In der G_2-Phase erfolgt eine erneute RNS-Synthese, wobei zur Vorbereitung der Mitose spezifische RNS-Moleküle geschaffen werden. Im Normalfall ist die Verdoppelung der DNS bei normalen und malignen Zellen die wichtigste Voraussetzung zum Wachstum und damit zur Zellvermehrung. Die Verdoppelung der DNS vollzieht sich in der S-Phase. In dieser Phase werden die Bausteine der DNS synthetisiert und von den Zellen eingebaut.
Der Eintritt einer Zelle in die S-Phase hängt von intra- und extrazellulären Faktoren ab.

Voraussetzungen zur DNS-Synthese (H. LETRÉ (52)):

1. Vorhandensein der Bausteine,
2. Aktivierung einer DNS-Polymerase,
3. die Primerqualität von vorhandener DNS.

Von der Bildung der DNS hängt in einem komplizierten Wege die Bildung der RNS und damit der Proteine ab. Die Synthese erfolgt nicht wahllos, sondern unterliegt einer

strikten Regulation. Diese Regulation erfolgt (44)

1. auf genetischer Stufe nach den von JACOB und MONOD entwickelten Vorstellungen,
2. direkt durch Abwandlung der Enzymfunktion im Sinne eines feed-backs.

Bei Tieren scheint zusätzlich die Wirkung von Hormonen eine Rolle bei diesen Regulationsmechanismen zu spielen.

Innerhalb der Krebszelle ist diese Regulation gestört. Die Störung betrifft sowohl den zeitlichen Ablauf als auch die biochemischen Produkte, die in ihrer Qualität verändert werden können.

2. Der Zellzyklus des Gewebeverbandes.

Die Schwierigkeit bei der Übertragung der Befunde an der Einzelzelle auf das Gesamttumorgewebe beruht darauf, daß für das Geschwulstwachstum kein einheitlicher Zellpool angenommen werden kann. Es liegen vielmehr differente Zellpopulationen mit unterschiedlichen Teilungs- und Entwicklungstendenzen vor. Es erscheint jedoch erlaubt, zur Bestimmung der Generationszeit eines Tumors eine Integration über alle Zellelemente vorzunehmen. Dies trägt durchaus den praktischen Gegebenheiten Rechnung, da wir vorläufig noch nicht wissen, ob, wann und auf welche Weise ein Proliferationsimpuls inaktive Zellelemente zu einer Stimulation anregen kann (6).

Andererseits sind autoradiographische Einbaustudien innerhalb des Gewebezyklus verschiedener Tumorzellstadien mit einheitlich definierter Chromosomenzahl und Chromosomengestalt sowie einheitlichem DNS-Gehalt von großem Interesse. Hierbei kann Aufschluß über die Frage eines eventuellen Zusammenhanges zwischen Ploidiegrad beziehungsweise DNS-Gehalt pro Zellkern und dem Zellzyklus erwartet werden. Die Frage, ob exponentielles oder nicht-exponentielles Wachstum vorliegt, ist dabei von entscheidender Bedeutung. Ebenso spielt eine Rolle, wann und ob die eine Wachstumsform in die andere übergeht. Am überschaubarsten scheint das Wachstum in seiner exponentiellen Phase zu sein, da hierbei nahezu alle Zellen an der Proliferation teilnehmen. Die Wachstumsfraktion beträgt innerhalb der exponentiellen Phase nahezu 100 %, somit ist die Generationszeit bei diesem Idealfall relativ konstant (49). In einer folgenden, nicht-exponentiellen Wachstumsphase kann sich die Generationszeit der Tumorzellen ändern oder es können bei gleicher Generationszeit weniger Zellen an der Proliferation teilnehmen, wodurch die Wachstumsfraktion sinkt.

3. Angriffspunkte der einzelnen Zytostatika im Ablauf des Zellzyklus:

Die Chemotherapie maligner Tumoren hat heute einen festen Platz neben der Operation und Bestrahlung in der Krebsbe-

handlung. Bei einer gezielten Anwendung wäre es notwendig, die Angriffspunkte der unterschiedlich wirkenden zytostatischen Substanzen zu kennen.

Eine Einteilung in spezifische und unspezifische Zytostatika wie sie MITTERMEYER 1968 (70) auf dem Deutschen Krebskongreß in Berlin vorschlug, erscheint durchaus sinnvoll. Unter unspezifischen Zytostatika versteht er die Substanzen, die alle Mitosestadien gleichermaßen beeinflussen. Dazu gehöre z.B. Aktinomycin-D. Bei den spezifischen Zytostatika unterscheidet er Mitoseblocker wie Colchizin, Colcemid, Vinblastin, Vincristin und Griseofulvin und S-Phasen-Blocker, in die er vor allem die DNS-Synthese-Blocker wie Thio-Ara-C, FUdR, Stickstofflost, Mitomycin-C und Hydroxyharnstoff einreiht. Phleomycin sei die bisher einzig bekannte Substanz, die eine spezifische Hemmwirkung auf die G_2-Phase habe, und für die erste Phase des Zellzyklus, die G_1-Phase, sei noch kein spezifisch blockierendes Zytostatikum gefunden; einzig die Kationen Lithium und Ammonium besitzen eine Hemmwirkung in diesem Abschnitt des Zellebens (94). Da diese Aufstellung noch unvollständig ist und sich andere Zytostatika nicht ohne weiteres in dieses Schema einordnen lassen, da ihr Wirkungsmechanismus noch ungeklärt ist, sei ein herkömmliches Schema der Zytostatikaeinteilung nach ihrem chemischen Verhalten auf den Zellstoffwechsel angefügt.

Tabelle 1 (modifiziert nach WITTE (99))

Gruppe	Chemische Kurzbezeichnung	Handelsname
I. Alkylantien		
1. N-Lost-Derivate	Trichlormethin	Sinalost
	Cyclophosphanid	Endoxan
	Chlorambucil	Leukeran
	Melphalan	Alkeran
2. Äthylenimin-Verbindungen	Tetramin	TEM
	Thiotepa	Thio Tepa
	Azetepa	Azetepa
3. Sulfonsäureester	Busulfan	Myleran
II. Pflanzenalkaloide	Demecalcin	Colcemid
	Vinblastin	Velbe
	Vincristin	Oncovin
	Podophylline	Proresid
III. Antimetaboliten		
1. Purinantagonisten	6-Mercaptopurin	Puri-Nethol
2. Pyrimidinantagonisten	Azathioprin	Immurel
	5-Fluoruracil	Fluor-uracil
	Cytosin-Arabinosit	
3. Folsäureantagonisten	Amethopterin	Methotrexat
	Aminopterin	

Forts. Tabelle 1

Gruppe	Chemische Kurzbezeichnung	Handelsname
IV. Antibiotica	Actinomycin-D	Sanamycin
	Actinomycin-D	Cosmegin
	Mitomycin-C	Mitomycin-C
V. Hormone	Progesteron	Progesteron
	Norgestrel	
	Prednisolon	Ultracorten-H
VI. Enzyme	Asparaginase	

B. Proliferationskinetik von Tumorzellen und ihre Beeinflussung durch Zytostatika.

Die in den letzten zwanzig Jahren entwickelte Methode der Autoradiographie gestattet einen genauen zeitlichen Einblick in die einzelnen Phasen des Zellzyklus. Die Aufgabe dieser Arbeit sollte eine Untersuchung über die Proliferation von Primärkulturen menschlicher Karzinome sein und darüberhinaus, mit Ausblick auf die Therapie, eine quantitative Aussage ermöglichen über die Wirkung zytostatisch wirksamer Substanzen auf Gewebekulturen menschlicher Tumoren.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt unter folgenden Gesichtspunkten:

1. Eine Betrachtung über das Wachstum der Primärexplantate von Tumoren unter dem Aspekt der H^3-Thymidin-Inkorporation.
2. Die Beeinflussung des Wachstums, d.h. der Proliferationsgröße, durch zytostatisch wirksame Substanzen, soweit es sich aus dem Thymidineinbau ablesen läßt.

Zusätzlich soll

3. das Verhalten des H^3-Index unter Zytostatika-Einwirkung mit dem morphologischen Verhalten verglichen werden.
4. Spezifische Beobachtung des Thymidineinbaues.

I. Material und Methode.

1. Untersuchte Gewebsarten.

Die Untersuchungen erfolgten an 27 Primärkulturen mit insgesamt 325 Einzeltests, hauptsächlich aus dem gynäkologischen Untersuchungsmaterial. Getestet wurden

12 maligne Ovarialtumoren

- 9 Ovarialkarzinome
- 2 Ovarialsarkome
- 1 Ovarialpapillom mit gesteigerter Proliferation

1 Ovarialkystom

7 Korpuskarzinome

2 Portiokarzinome

1 Mammakarzinom

1 Bronchialkarzinom

2 Hirntumoren und

1 Neurofibrom aus dem Vulvabereich.

2. Methoden der Kultivierung.

Die Kultivierung der Gewebe erfolgte nach dem von LIMBURG und KRAHE (58) angegebenen Trypsinierungsverfahren in der Modifikation nach DULBECCO und VOGT (14) auf Glimmerplättchen in Leighton Tubes.

Zunächst wird das steril entnommene Gewebe mechanisch mit einer Schere zu einem Gewebsbrei zerkleinert. Mit Hilfe

eines Magnetrührers wird dieser Brei nach Zusatz von 0,25 - 2 %iger Trypsinlösung (gelöst in PPS, phosphatgepufferte Lösung) bei 37 ° C gerührt.
Nach 10 bis 20 Minuten werden die gelösten Einzelzellen möglichst ohne Gewebsanteile in einen zweiten sterilen Kolben gegossen. Um die weitere Trypsinierung der abgegossenen Zellsuspension zu unterbrechen, kühlt man die Suspension mit Hilfe eines Eisbades auf 4 ° C ab. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis kein solides Gewebe mehr im Trypsinierungskolben vorhanden ist. Die gekühlte Zellsuspension wird nach Abschluß der Trypsinierung grob filtriert durch eine Mullage und anschließend zentrifugiert bei 800 bis 1.000 Umdrehungen/min. Das Zellsediment wird mit PPS ausgewaschen, um eine Zellschädigung beim Anzüchten durch Trypsin zu vermeiden. Anschließend wird es erneut zentrifugiert. Das Zellsediment wird mit der Nährflüssigkeit bis zu einer Zellzahl von 2 bis 4 Mill. lebender Zellen pro ml verdünnt. Die Nährflüssigkeit setzt sich wie folgt zusammen:

TCM (Morgan, Morton, Parker)	25,0
Hanks	55,0
Vitamine	5,0
Glutamine	5,0
Kalbsserum	10,0

Zur Resistenztestung wird 1 ml Zellsuspension pro Leighton Tube abgefüllt. Nachdem die Einzelzellen auf Glimmerplätt-

chen flächenhaft zum Zellrasen ausgewachsen sind, erfolgt die Zugabe der Zytostatika entsprechend dem methodischen Vorgehen beim Krebs-Chemotherapie-Resistenztest.

Es werden folgende zytostatisch wirksame Substanzen in therapieadaequaten Konzentrationen zugesetzt:

Tabelle 2

Endoxan (ASTA)	50,0	gamma/ml
Trenimon (BAYER)	0,01	gamma/ml
Thio Tepa (LEDERLE)	0,42	gamma/ml
Velbe (E. LILLY)	3,33	gamma/ml
Proresid (SANDOZ)	20,0	gamma/ml
VB 74 (SANDOZ)	20,0	gamma/ml
VM 26 (SANDOZ)	1,0	gamma/ml
Methotrexat (LEDERLE)	1,0	gamma/ml
Progesteron (SCHERING)	17,0	gamma/ml
Norgestrel (SCHERING)	20,0 + 1,0	gamma/ml
Ultracorten-H (CIBA)	250,0	gamma/ml
Asparaginase (BAYER)	0,2 + 1,0	I.E./ml
Wobe Mugos (MUKOS)	16,7	gamma/ml

Die Konzentrationen entsprechen einer Stoßtherapie, bezogen auf 60 kg Körpergewicht oder 5 l Blut.

3. Thymidininkorporation.

Danach erfolgt die Zugabe von H^3-Thymidin (spezifische Aktivität 2 C/mMol bezogen von Fa. Buchler, Braunschweig) in einer Konzentration von 2 µC/ml Nährlösung. Die Inkubationszeit des H^3-markierten Thymidins beträgt 120 Minuten. Fixierung, Beschichtung mit Filmemulsion und Entwicklung der Autoradiogramme erfolgen modifiziert nach einem von HECKMANN und Mitarbeiter angegebenen Verfahren (30).

Die Glimmerplättchen werden 30 Minuten in Äther-Alkohol (50:50) fixiert. Dabei werden speziell für diesen Zweck angefertigte Glimmerplättchenständer verwendet. Der Fixierlösung ist 1 bis höchstens 3 Tropfen Essigsäure (99,9 %) pro ml zugesetzt (persönliche Mitteilung von Dr. Eckert, Pharmazeutisches Department der biochemischen Laboratorien der Sandoz KG, Basel) zur Verhinderung bzw. Vermeidung einer sogenannten "chemischen Autoradiographie", die durch Austreten intrazellulärer Enzyme bewirkt werden kann. Nach der Fixierung werden die Glimmerplättchen mit der Zellschichtseite nach oben auf Objektträger mit Caedax (Merck) aufgeklebt. Hierauf erfolgt eine Nachbehandlung der Testplättchen im Vakuumexsikkator für mindestens 3 Stunden zur Entfernung der Essigsäure, die ihrerseits eine Filmschwärzung hervorrufen kann.

Das Auftragen der Filmemulsion Ilford G 5 - bezogen in der Verdünnung der Fa. Sandoz, Basel - erfolgt, ebenso wie die

Entwicklung der Autoradiogramme, zur Herabsetzung des back-ground bei völliger Dunkelheit. Zum Gebrauch wird die Emulsion auf 40 ° C erwärmt und in eine ebenfalls auf 40 - 50 ° C vorgewärmte Petrischale gegossen. Dann werden die Objektträger mit den Glimmerplättchen mit der Schichtseite nach unten für 30 Sekunden bis 1 Minute in die Emulsion getaucht. Nach dem Herausnehmen läßt man die Emulsion von dem Objektträger auf Filterpapier über die Kante bei ca. 45 ° ablaufen, so daß eine homogene Filmschicht auf dem Glimmerplättchen von 3 - 5 µ Dicke entsteht. Die Präparate werden aufbewahrt in Objektträgerkästen, denen Kupfersulfat zugesetzt ist. Außerdem werden sie in mehrere Lagen schwarzen Papiers gewickelt, um eine Belichtung der Autoradiogramme zu verhindern. Die Expositionszeit beträgt 18 - 24 Tage bei 4 ° C.

Die Entwicklung und Fixierung erfolgt bei 21 ° C - ebenfalls bei völliger Dunkelheit. Die Entwicklungsdauer beträgt 3 - 5 Minuten. Als Entwickler für Ilford G 5 wird verwendet:

1. 1,5 g Metol
2. 6,0 g Hydrochinon
3. 50,0 g Na_2SO_3
4. 32,0 g Na_2CO_3
5. 2,0 g KBr

   ad 1 l Aqua dest.

Diese Substanzen müssen in der angegebenen Reihenfolge gelöst werden. Das Aqua bidest. kann zur besseren Löslichkeit etwas erwärmt werden.

Das Fixierbad wird angesetzt mit

1. 300 g $Na_2S_2O_3$
2. 12 g Na_2SO_3
3. 12 g $K_2S_2O_5$

ad 1 l Aqua bidest.

Vor Gebrauch 1:5 bis 1:10 verdünnen.

Im Anschluß daran werden die Autoradiogramme gewässert, getrocknet und schließlich nach PAPANICOLAOU in der Modifikation von LIMBURG (55) durch die Emulsion hindurch gefärbt. Sodann erfolgt die Umbettung der Glimmerplättchen auf neue Objektträger mit der Schichtseite, d.h. mit der von Zellen bewachsenen Seite, nach unten.
Die Autoradiogramme werden unter dem Mikroskop bei 250-facher Vergrößerung ausgewertet durch Auszählen von 2.500 Zellen in 5 Zählfeldern, die statistisch über das Glimmerplättchen verteilt sind. Dabei wird die Anzahl der markierten Zellen und ihr Verhältnis zur Gesamtzellzahl ausgewertet (sog. H^3-Index). Die Anzahl der Silberkörner über den Kernen wird abgeschätzt. Außerdem wird eine nochmalige morphologische Beurteilung durchgeführt, um Verfälschungen, die bei der Herstellung der Autoradiogramme entstehen können, auszuschließen.

4. Parameter zur Bestimmung der Tumorzellproliferation.

Eine ideale Möglichkeit für Zellumsatzstudien ist die Einführung von Tritium-markiertem Thymidin, das stabil in die DNS als eine der notwendigen Basen eingebaut wird. Die besondere Eignung von Tritium für Einzelzellautoradiographien beruht auf den günstigen physikalischen Daten dieses Isotopes. Die lange Halbwertzeit von 12,5 Jahren garantiert eine lange Verwendbarkeit. Die geringe Energie der reinen Beta-Strahlen wird zu über 50 % bereits in einem Abstand von 1 µ Emulsionsdicke absorbiert, so daß eine Schwärzung der Filmemulsion direkt über der Strahlenquelle mit nur geringer Streuung entsteht und die Silberkörner sich an die Kerngrenzen halten. Durch die radioaktive Markierung mit H^3-Thymidin von Zellen in der Gewebekultur ist es möglich, alle Zellen einer Population zu identifizieren, die sich gerade in der S-Phase befinden.
Die Generationszeit als wichtigster Parameter für die Proliferation kann aus dem H^3-Index bestimmt werden (16, 18). Der H^3-Index, angegeben in Prozent, ist der Quotient aus der Zahl der markierten Zellen mal 100 und der Gesamtzellzahl (1). Andererseits besteht eine direkte Beziehung zwischen der Zahl der markierten Zellen und der DNS-Phase, sowie zwischen der Gesamtzellzahl und der Generationszeit (2). Die Generationszeit ist demzufolge gleichzusetzen mit der DNS-S-Phase mal der Gesamtzellzahl dividiert durch die Zahl der markierten Zellen (3). Die Beziehung DNS-S-Phase

mal 100 dividiert durch den H^3-Index entspricht ebenfalls der Generationszeit einer Zellpopulation (4).

(1) $$\frac{\text{Zahl der markierten Zellen x 100}}{\text{Gesamtzellzahl}} = H^3\text{-Index \%}$$

(2) $$\frac{\text{Zahl der markierten Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} = \frac{\text{DNS - S - Phase}}{\text{Generationszeit}}$$

(3) $$\text{Generationszeit} = \text{DNS-S-Phase} \times \frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{Zahl d. markierten Zellen}}$$

(4) $$\text{Generationszeit} = \frac{\text{DNS-S-Phase x 100}}{H^3\text{-Index}}$$

Diese Beziehungen liefern, wie oben erwähnt, selbstverständlich nur einen Durchschnittswert für alle an der Proliferation teilnehmenden Zellen. Sie können keine Aussagen machen über das Verhalten der Einzelzelle.

Die Dauer der DNS-Verdoppelungszeit kann elegant durch die sogenannte Doppelmarkierung mit H^3- und C^{14}-Thymidin bestimmt werden (76).

5. Autoradiographie und Zytostatikatest.

Schon 1963 hatten ÖHLERT, DÖRMER und LESCH (72) sowie WOLBERG und BROWN (100) die Frage aufgeworfen, ob die Testung bestimmter Zytostatika hinsichtlich ihrer Wirkung auf die DNS-Neubildung mit der Methode der Autoradiographie möglich sei. Ein solcher Test ist von besonderem realistischem Interesse. Histologisch gleichartige Tumoren können auf das gleiche Medikament different reagieren. Unsere Untersuchungen wären somit eine quantitative Untermauerung des Krebs-Chemotherapie-Resistenztestes, der routinemäßig an der Universitäts-Frauenklinik Homburg-Saar durchgeführt wird. Primäre und sekundäre Resistenzen werden auf diese Weise nicht nur morphologisch erfaßt, sondern das Ausmaß der Resistenz oder Sensibilität kann semiquantitativ bestimmt werden.

Eine in vivo-Markierung menschlicher Tumoren und Gewebe unterliegt zahlreichen Beschränkungen und Einwendungen (45). Untersuchungen, die dennoch ausgeführt wurden (z. 2, 8, 39, 48, 81), zeigen jedoch eine Übereinstimmung zwischen in vivo- und in vitro-Ergebnissen (6, 11). Die in vitro-Inkubationsmethode erscheint vom ärztlichen Standpunkt her angebrachter. Eine Strahlengefährdung des Patienten ist ausgeschlossen. Bei dieser Methode werden unmittelbar nach Gewebsentnahme, die durch Nadelbiopsie, Kürettage oder Excision erfolgt, die gewonnenen Gewebsproben in Lösungen inkubiert, denen radioaktiv markierte

Substanzen und, gegebenenfalls, zytostatische Substanzen zugesetzt sind. Nach der Inkubationszeit werden die Präparate entweder abgetupft und Smears hergestellt (89, 93) oder die Gewebe werden fixiert, eingebettet und histologisch aufgearbeitet (72). Diese Verfahren erscheinen wegen der sehr kurzen Einwirkungszeit der Zytostatika (1 - 2 Stunden) und der beschränkten Diffusionsstrecke des Thymidins in das Gewebe und dem damit verbundenen Konzentrationsabfall (79) in ihrer Aussage beschränkt.

Zusammengefaßt legen folgende Gründe die autoradiographischen Untersuchungen der Gewebe in der in unserer Methodik angegebenen Weise nahe:

a) Bessere Überschaubarkeit des Versuches (LETTRÉ (54)),
b) der von LIMBURG und KRAHE (53) schon eingeführte Resistenztest,
c) die gegen die übrigen Verfahren angebrachten Argumente.

6. Methodenkritik.

Bei der hier beschriebenen Methode läßt sich ein hohes Auflösungsvermögen durch Einhaltung folgender Bedingungen erreichen (27):

a) H^3-markiertes Thymidin ist ein reiner Betastrahler mit geringer Zerfallsenergie und damit auch geringer Bahnlänge der Teilchen; die Reichweite ist nämlich, außer von der Art des absorbierenden Mediums, von der Energie abhängig, mit der die Teilchen emittiert werden. Die

maximale Zerfallsenergie des Wasserstoffisotopes Tritium (H^3) beträgt nur etwa 18.000 eV, was einer Reichweite von weniger als 2 µ in der Fotoemulsion entspricht.

b) Eine geringe Dicke des Präparates ist dadurch gegeben, daß nur einschichtig ausgewachsene Zellkulturen verwendet werden (77).

c) Der Abstand Strahlungsquelle - Emulsion kann dadurch gering gehalten werden, daß die Kulturen direkt mit der Emulsion überschichtet werden.

d) Es werden flüssige Emulsionen verwandt; da sie feinkörniger sind, ist ihr Auflösungsvermögen ebenfalls besser.

Weitere Fehlerquellen werden durch folgendes Vorgehen ausgeschlossen (3, 15, 20, 24, 71, 75):

a) Da H^3-markiertes Thymidin als Basenbaustein spezifisch nur in die DNS eingebaut wird und diese im Zellkern lokalisiert ist, ist eine Diffusion der radioaktiven Substanz nicht zu befürchten, da nur die intranukleäre Substanz erfaßt wird. Das an der Oberfläche haftende Thymidin wird durch die Nährlösung weggespült.

b) Auf eine Gefriertrocknung kann bei der Fixation verzichtet werden, da nur das in die DNS eingebaute Isotop bei der Auswertung berücksichtigt wird.

c) Die Verwendung von Zellkulturen schließt eine Beeinflussung der Emulsion durch das Einbettungsmaterial aus;

eine Artefaktbildung durch das Nährmedium oder die Fixationsflüssigkeit läßt sich nicht feststellen.

d) Die Dosis des H^3-Thymidins ist so gewählt, daß eine Schädigung durch das Radioisotop ausgeschlossen werden kann. Zur Sicherheit werden zu jeder Tumorkultur Kontrollen mit nichtmarkiertem Thymidin mitgeführt und zum morphologischen Vergleich gegenüber dem markierten Gewebe herangezogen. Es kann keine strahlungsbedingte Schädigung festgestellt werden.

e) Durch die Verwendung jeweils frisch angesetzter Filmemulsionen können Artefakte ebenfalls vermieden werden.

f) Die lange Halbwertzeit des Tritiums von 12,5 Jahren läßt einen breiten Spielraum der Expositionszeit. (Es ist wenig sinnvoll, die Expositionszeit über 2 Halbwertzeiten hin auszudehnen, da dann 75 % des Isotops zerfallen sind.) Die Expositionszeit bei den vorliegenden Untersuchungen liegt zwischen 18 und 24 Tagen, ein Unterschied, der im Vergleich zu der langen Halbwertzeit des Tritiums vernachlässigt werden kann.

g) Der Feuchtigkeitsgehalt während der Expositionszeit wird niedrig gehalten, so daß der Kontakt Gewebe - Emulsion nicht verloren gehen kann.

h) Die Schleierkornbildung wird eingeschränkt durch kühle Lagerung der Emulsion während der Aufbewahrung und

Exposition. Außerdem wird mit der Emulsion nur bei absoluter Dunkelheit hantiert.

i) Ein Verlust des Radioisotops wird dadurch vermieden, daß die Kulturen erst nach Entwicklung und Fixierung der Fotoemulsion durch die Emulsion gefärbt werden. Eine Farbaufnahme der Emulsion kann durch eine geringe Dicke der Emulsion vermieden werden.

j) Artefakte, die während der Entwicklung und Fixierung entstehen können, werden durch Vermeidung mechanischer Insulte und möglichst staubfreier Aufarbeitung ausgeschlossen.

II. Die Proliferation der Tumorgewebe und ihre Beeinflussung durch Zytostatika.

Die Auswertung der Autoradiogramme führte zu folgenden Ergebnissen:

a) Bei allen untersuchten Geweben finden sich Zellkerne, die sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in der Synthese-Phase (S-Phase) befinden. Sie zeigen eine Silberkornanhäufung über dem Kern, die im Durchschnitt zwischen 10 und 100 Körnern beträgt. Die Anzahl der Silberkörner über den Kernen in der Interphase ist jedoch von Kultur zu Kultur unterschiedlich. Die Kerne zeigen durch den Eintritt in die S-Phase ihre Potenz zu einer folgenden Mitose an, d.h. zu einer echten Vermehrung. Es kann somit in allen Kulturen ein echtes Wachstum nachgewiesen werden.

b) Ebenfalls finden sich bei allen untersuchten Tumoren resistente und sensible Zellen. Der Grad der morphologischen Zellschädigung wird abgestuft beurteilt.

+	Sichtbare Veränderungen des Zytoplasmas und Zellkernes wie Vakuolen, Kern- und Plasmaverklumpung.
+ (+)	Wenige Zellnekrosen, daher aufgelockerter Zellrasen. Restliche Zellen zum Teil intakt, zum Teil Vakuolen, Kern- und Plasmaverklumpung.
++	Gehäufter Detritus, nur noch wenige intakte Zellen.
+++	Völlige Auflösung der Zellen.

1. Proliferationsverhalten der Tumorzellen.

Die Schnelligkeit des Zellwachstums ist tumorspezifisch; sie drückt sich aus in der Höhe des H^3-Index und kann durch keine histologischen Kriterien vorausgesagt werden. Die Zeit, die ein Gewebe braucht vom Auspflanzen bis zum vollständig ausgewachsenen Zellrasen, schwankt zwischen 2 und 10 Tagen. Die folgende Tabelle verdeutlicht diese tumorspezifische Proliferationskinetik.

Tabelle 3

Gewebeart	Anzahl	I sehr gut markiert über 1 %	II gut markiert 0,24–0,99%	III gering markiert unter 0,24%
Ovarial-Karzinom	9	3	3	3
Korpus-Karzinom	7	4	-	3
Ovarial-Sarkom	2	1	1	-
Ovarial-Papillom	1	1	-	-
Ovarial-Kystom	1	-	-	1
Portio-Karzinom	2	2	-	-
Mamma-Karzinom	1	-	-	1
Bronchial-Karzinom	1	-	-	1
Hirn-Tumoren	2	-	-	2
Neurofibrom	1	-	-	1
Summe:	27	11	4	12

Die Tabelle 3 bestätigt die Erfahrung aus dem Krebs-Chemotherapie-Resistenztest, daß bei Tumoren mit gleicher Histologie und gleichem Reifungsgrad die Wachstumstendenzen verschieden sein können.
Die folgenden Bilder zeigen die typischen Einbaumuster in unterschiedlichen Abstufungen. Zum Vergleich werden unbehandelte Kontrollen ohne Thymidinzusatz herangezogen. Die Zellen auf den Kontrollbildern sind aufgenommen am gleichen Tag nach dem Auspflanzen wie die entsprechenden autoradiographischen Bilder.

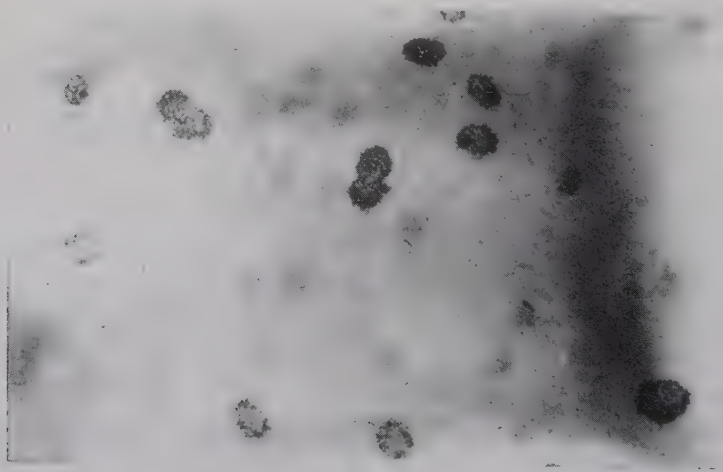


Abbildung 1: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms. Der Markierungsindex liegt über 1 %. Keine Zytostatikainkubation.
Vergr.: 16 x 8 x 2

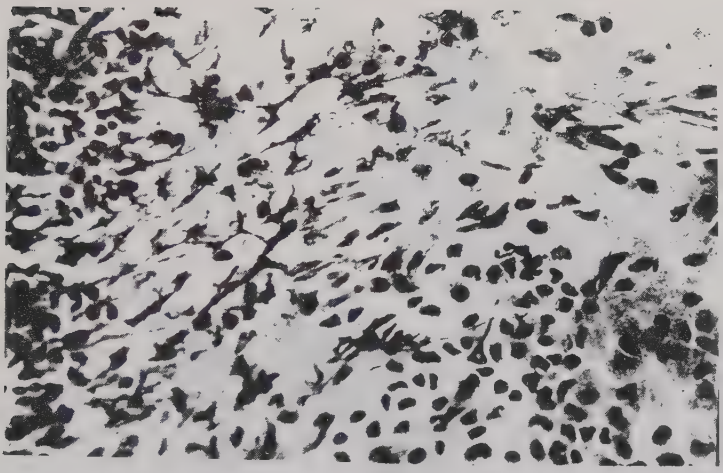


Abbildung 2: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms mit gleich schneller Wachstumstendenz wie in Abb. 1.

Vergr.: 16 x 8 x 2

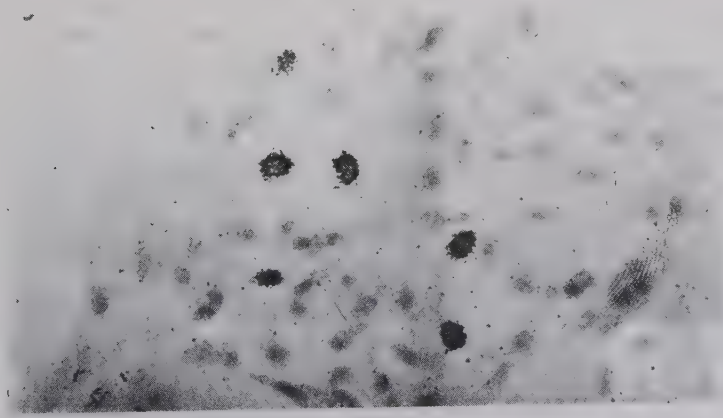


Abbildung 3: Zellen eines menschlichen Korpuskarzinoms. Der Markierungsindex liegt über 0,25 %. Keine Zytostatikainkubation.

Vergr.: 16 x 8 x 2

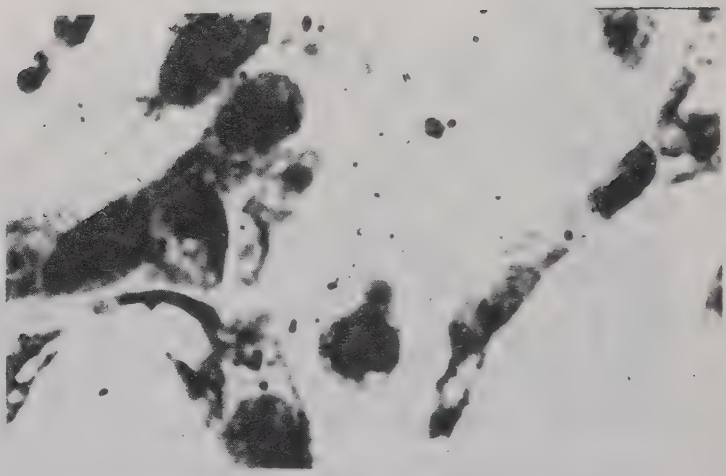


Abbildung 4: Zellen eines menschlichen Korpuskarzinoms ohne Zytostatika- und Thymidininkubation mit gleich schneller Wachstumstendenz wie in Abb. 3.
Vergr.: 40 x 8 x 2

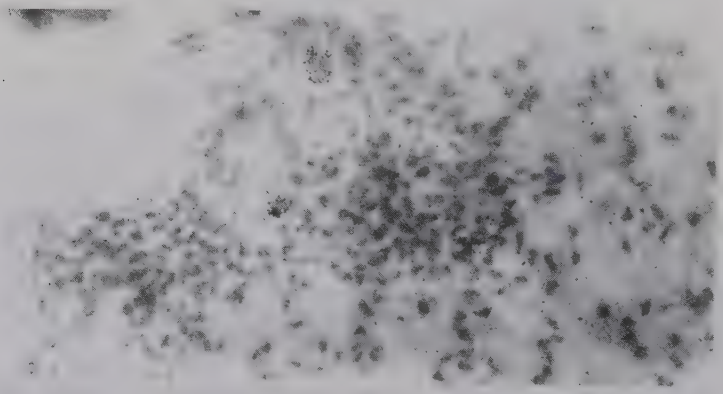


Abbildung 5: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms. Der Markierungsindex liegt unter 0,24 %. Man beachte gleichzeitig die geringere Markierungsintensität. Keine Zytostatikainkubation.
Vergr.: 16 x 8 x 2

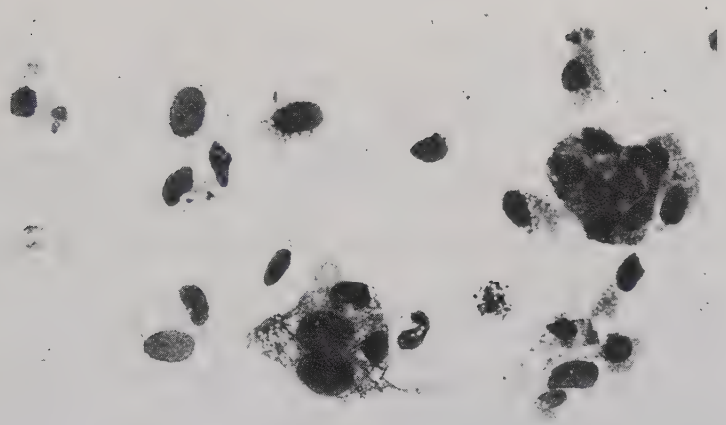


Abbildung 6: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms mit geringer Proliferationstendenz.
Vergr.: 16 x 8 x 2

Tabelle 4 zeigt die Übereinstimmung von Wachstumsdauer und Markierungsindex für die malignen Ovarialtumoren und die Korpuskarzinome.

Hierdurch wird bestätigt, daß schnell zum Zellrasen auswachsende Tumoren ihre größere Proliferationsaktivität in einem höhreren H^3-Index zeigen.

Tabelle 4:

Gewebeart	maligne Ovarialtumoren	Korpuskarzinom
Anzahl	12	7
durchschnittliche Wachstumsdauer aller Tumoren in Tagen	4	5,4
durchschnittliche Wachstumsdauer aller Tumoren der Gruppen I und II in Tagen (starke Markierung)	3,1	3,74
durchschnittliche Wachstumsdauer aller Tumoren der Gruppe III in Tagen (geringe Markierung)	6,7	7,7

Die Frage, ob anaplastische Tumoren eine höhere Proliferationsaktivität als ausdifferenzierte Karzinome besitzen, kann an Hand des Materials nicht eindeutig geklärt werden. Eine Tendenz dazu zeichnet sich allerdings ab. Von 5 untersuchten undifferenzierten Karzinomen (4 Ovarialkarzinome, 1 Korpuskarzinom) sind 4 sehr gut markiert. Bei ihnen sind die höchsten H^3-Indizes zu finden (zwischen 14,9 und 2,5 %). Sie gehören damit alle zur Gruppe I. Dieser Befund fällt vor allem bei den Ovarialkarzinomen auf, da hier zur Gruppe I nur anaplastische Tumoren gehören, während der Markierungsindex ausdifferenzierter Karzinome zwischen 0,25

und 1,0 % liegt. Das undifferenzierte Ovarialkarzinom-Gewebe, dessen Proliferation unter 0,25 % liegt und somit zur Gruppe III gehört, stammt von einer Lymphknotenmetastase.

Wie weitere Untersuchungen zeigen, besteht ein Unterschied zwischen Proliferationsaktivität von solidem Tumormaterial und Kulturen, die aus Metastasen bzw. Ascites und Pleurapunktat stammen. Von insgesamt 13 soliden malignen Korpuskarzinomen und Ovarialtumoren zeigen 11 eine gute Markierung und gehören somit zu den Gruppen I und II, während sich von 7 untersuchten Metastasen nur 1 gut markiert hat, d.h. zur Gruppe I gehört. Diese Metastase stammt von einem undifferenzierten Ovarialkarzinom, ein Befund, der das oben über die undifferenzierten Karzinome Gesagte bestätigt. Letztlich kann erwähnt werden, daß die gutartigen Tumoren, 1 Neurofibrom, 1 Ovarialkystom sowie die beiden Hirntumoren in ihrem H^3-Index keine starke Proliferation zeigen, sondern daß bei ihnen Zellen, die sich in der Synthese-Phase befinden, nur vereinzelt nachgewiesen werden können. Auf Grund der diskutierten Befunde ist ein Zusammenhang zwischen H^3-Index und Proliferationsgrad, Wachstumspotenz und dem jeweiligen Malignitätsgrad mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen.

Die Tabelle 5 zeigt die Beziehungen zwischen H^3-Index und mittlerer Lebensdauer (bezogen auf die Generationszeit von je 2.500 ausgezählten Einzelzellen pro Plättchen).

Tabelle 5

Gruppe	H^3-Index in %	mittlere Lebensdauer in Tagen
I. H^3-Index über 1 %		
a) Ovarialtumor	14,9	40 Std.
" "	4,0	150 " ca. 6 Tage
" "	2,5	240 " 10 "
" "	5,0	120 " 5 "
" "	1,68	353 " 15 "
b) Korpuskarzinom	2,98	200 " 8 "
" "	1,44	400 " 16 "
" "	2,94	200 " 8 "
" "	7,2	85 " 3,5 "
c) Portiokarzinom	3,4	170 " 7 "
" "	1,76	350 " 15 "
II. 0,99 % > H^3- I. > 0,24 %		
Ovarialtumor	0,24	2.400 Std. 100 Tage
" "	0,28	2.400 " 100 "
" "	0,44	1.200 " 50 "
" "	0,24	2.400 " 100 "
III. H^3-Index < 0,24 %		alle anderen getesteten Kulturen
	0,24 >	über 100 Tage

Bei der Berechnung der mittleren Lebensdauer ist eine Synthesezeit von 6 Stunden zugrunde gelegt.

H^3-Index-Bestimmungen anderer Autoren zeigt die folgende Tabelle 6.

Tabelle 6

Tumorart	H^3-Index in %	mittlere Lebensdauer	Autor
Ovarialkarzinom	0,44		Titus,Shorter (90)
Ovarialkarzinom (Ascites)	2,8–4,5	3-5 d	Clarkson,Ota, O'Connor (7)
Kystadenom des Ovars	0,36	45–60 d	Johnson,Rubini, Cronkite,Bond (33)
Korpuskarzinom	0,20		Coons, Norman, Nahum (9)
" "	7,24		" "
" "	6,0		Titus,Shorter (90)
" "	4,8	130 h	Stell (88)
Zervixkarzinom	4,8	130 h	" "
" "	5,64		Coons,Norman,Nahum (9)
" "	3,86		" " "
Karzinosarkom des Uterus	2,5		Titus, Shorter (90)
Mammakarzinom (entdifferenziert)	1,0		" " "
" "	1,6		" " "
" "	0,74		Coons,Norman,Nahum (9)

Forts. Tabelle 6

Tumorart	H^3-Index in %	mittlere Lebensdauer	Autor
Mammakarzinom (entdifferenziert)	0,14	120 d	Johnson, Rubini, Cronkite, Bond (33)
" "	0,7	30-45 d	Johnson, Bond (32)
Fibroadenom der Mamma	2,6	9-12 d	" " "
Milchgangsepithel der Mamma	1,0	30 d	" " "
Keimschicht der Mamma	0,38	45-60 d	Johnson, Rubini, Cronkite, Bond (33)
Magenkarzinom	9,0	66,0 h	Oehlert, Dörmer Lesch (72)
Colonkarzinom	22,0	27,0 h	" "
" "	8,0	75,0 h	Baserga, Henegar, Kisielski, Lisco (2)
Dickdarmschleimhaut (Kryptenepithel)	15,0	24 h	Lipkin, Bell, Sherlock (59)
Hepatozelluläres Karzinom (Metastase)	2,5	240 h	Baserga, Henegar, Kisielski, Lisco (2)
Plattenepithelkarzinom der Zunge	7,0	85,8 h	Oehlert, Dörmer, Lesch (72)
Papillär wachsendes Karzinom der Kieferhöhle	15,0	39,6 h	Oehlert, Dörmer, Lesch (72)
kleinzelliges Bronchialkarzinom	10,2	60 h	" "
Glioblastoma multiforme	0,6	30 d	Killmann (36)

Forts. Tabelle 6

Tumorart	H^3-Index in %	mittlere Lebensdauer	Autor
normales Knochenmark:			
Myeloblasten	35-93	32-36 h	Cronkite,Bond, Fliedner,Killmann (10)
Promyelozyten	60	20-25 h	Lajtha,Oliver, Ellis (46,47)
Akute Leukose:			
Paramyeloblasten	5-15	2-3,5 d	Killmann,Cronkite, Robertson,Fliedner, Bond (38)
"	14,5	20 h	Maurer (67)
Plasmozytom	2,4-3,6	2-6 d	Killmann,Cronkite, Fliedner,Bond (37)
Lymphknoten-hyperplasie:			
Plasmablasten	40	20 h	Theml,Trepel,Rastetter,Bergmann (89)
Lymphatische Stammzellen	50	14 h	" "
Lymphknoten-Retikulosarkom	25	28 h	" "

a) Ovarialkarzinome

Hierbei schwanken die Angaben für den H^3-Index zwischen 4,5 % (7) und 0,44 % (90). In diesen Rahmen fügen sich die eigenen Werte, die in ihrer Mehrheit dazwischen liegen, gut ein. Der extrem hohe Wert von 14,9 % stammt, wie die anderen eigenen hohen Indizes, von anaplastischen Tumoren. Auch TITUS und SHORTER (90) fanden beim undifferenzierten Mammakarzinom höhere Einbauraten als COONS u.a. (9, 32, 33) beim ausdifferenzierten Mammakarzinom. Die eigenen Untersuchungen zeigen, daß der H^3-Index und damit die Proliferation der anaplastischen Karzinome um den Faktor 5 - 10 über dem der differenzierten Karzinome liegt. Das von uns untersuchte Kystadenom des Ovars hat eine schwache Proliferationsaktivität mit einem H^3-Index unter 0,24 % und wird aus diesem Grunde in die 3. Gruppe eingereiht.

b) Korpuskarzinome

Auch für die Zellen der untersuchten Korpuskarzinome findet sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Höhe des H^3-Index und der jeweiligen Proliferationsaktivität. COONS (9) fand hierbei Unterschiede im Einbau zwischen 0,2 und 7,2 %. Die Werte anderer Autoren (88, 90) liegen dazwischen. Die eigenen Ergebnisse, die zwischen 7,2 und 0,1 % liegen, reihen sich hier gut ein.

c) Zervixkarzinom

Auch beim Plattenepithelkarzinom der Portio kann eine Übereinstimmung der Befunde von COONS und STELL (9, 88) (5,63 - 3,68 %) und den eigenen Befunden (3,4 - 1,76 %) festgestellt werden.

d) Mammakarzinom

Das von uns untersuchte Mammakarzinom weist eine Proliferation unter 0,2 % auf und gehört damit zur Gruppe III. Auf Grund dieser Einzelaussage läßt sich jedoch keine allgemeine Schlußfolgerung ziehen; der Befund deckt sich aber mit den Angaben anderer Autoren (9, 32, 33), die dabei Werte unter 1 % fanden. Dabei sind die oben erwähnten, undifferenzierten Karzinome, deren Index zwischen 1 bis 1,6 % liegt, ausgenommen.

Zusammengefaßt ergibt sich folgendes:

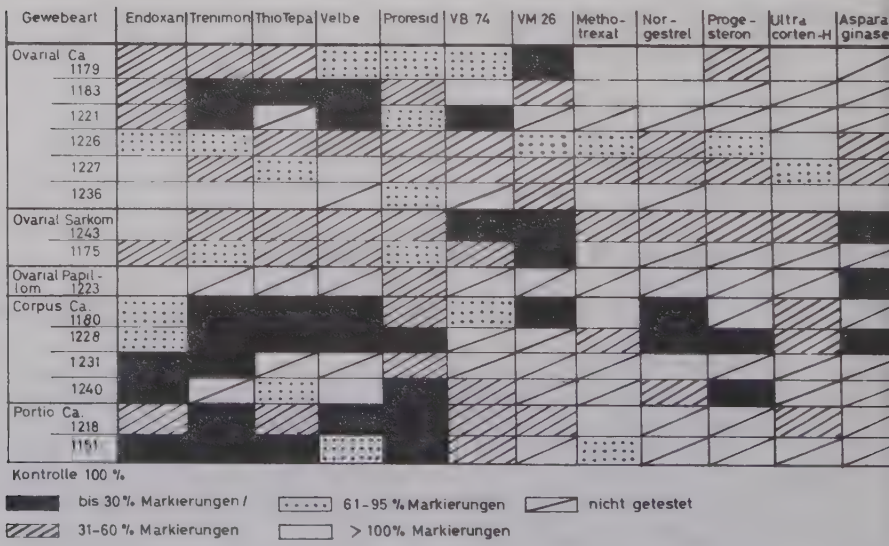
A. Alle ausgepflanzten Tumorgewebe zeigen ein echtes flächenhaftes Wachstum.
B. Es besteht ein direktes Verhältnis zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Proliferationsgrad. Dies ist erkennbar im Autoradiogramm an der Anzahl der DNS-synthetisierenden Zellen.
C. Schwankungen im Thymidineinbau bei histologisch gleichartigen Tumoren sind ein Hinweis auf das individuelle Wachstumsverhalten der einzelnen Tumoren.

2. Wirkung von Zytostatika auf die Proliferation.

Den Einfluß der zytostatisch wirksamen Substanzen auf den Thymidineinbau zeigt das folgende Onkobiogramm. Zur Auswertung kommen selbstverständlich nur solche Tumoren, deren Markierungen und Markierungsveränderungen hoch genug sind, um statistisch signifikante Ergebnisse zu bringen.

Tabelle 7

Die Veränderung des H^3-Index an Malignomzellen des weiblichen Genitale unter Einwirkung cytostatischer Substanzen



Das Onkobiogramm macht deutlich, daß der Einbau von Thymidin durch Zytostatika verändert wird und daß die Veränderungen

bei den einzelnen Zytostatika sehr unterschiedlich sind. Beachtet man jedoch die pharmakologische Verwandtschaft verschiedener Substanzen, so erscheint es sinnvoll, die Wirkung von verwandten Zytostatika gemeinsam zu betrachten.

a) Alkylierende Substanzen:

Die alkylierenden Substanzen Endoxan, Trenimon und Thio Tepa führen zu folgenden Veränderungen des H^3-Index, bezogen auf die unbehandelten Kontrollen:

	Anzahl der Teste	Senkung	Steigerung
Endoxan	15	11	4
Trenimon	13	12	1
Thio Tepa	12	10	1

Bei allen 3 Alkylantien ist in mehr als in 74 % der getesteten Fälle eine Verminderung des Thymidineinbaues eingetreten. Es ist jedoch auch zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des Einbaues in 6 Fällen gekommen, wobei das relativ gehäufte Auftreten bei Endoxan in die Augen fällt.

b) Vincaalkaloide:

Das Vinblastinsulfat Velbe zeigt ein ähnliches Verhalten in seiner Wirkung auf den Thymidineinbau wie die alkylierenden Substanzen. Bei 12 Untersuchungen ist es 10mal zu

einer Senkung und 2mal zu einer Erhöhung des Markierungsindex gekommen.

c) Podophyllinsäurederivate:

Die Wirkung der Podophyllinsäurederivate Proresid (Äthylhydrazid der Podophyllinsäure) sowie des VB 74 und des VM 26 ist unterschiedlich zu dem Verhalten der Alkylantien. Es kommt hier nur in einem Falle, bei der Wirkung von VB 74, zu einer geringen Steigerung des Einbaues, die jedoch keine statistische Signifikanz aufweist.

	Anzahl	Steigerung	Senkung
Proresid	15	-	15
VB 74	11	1	10
VM 26	9	-	9

Die unterschiedliche Wirkung der Podophyllinsäurederivate wird sich noch deutlicher ausdrücken in dem weiter unten zu besprechenden Vergleich der morphologischen Wirkungen mit den Veränderungen des Thymidineinbaues.

d) Antimetabolite:

Der Antimetabolit Methotrexat zeigt überraschenderweise bei 11 untersuchten Fällen nur 5 geringe bis mittlere Senkungen, 6mal jedoch eine beträchtliche Steigerung des Thymidineinbaues, d.h. in mehr als der Hälfte der Fälle werden die Zellpopulationen nach Methotrexatzusatz zu einem Wachstum angeregt, das das der Kontrolle übertrifft.

e) Hormone:

Das Verhalten nach Hormoneinwirkung ist unterschiedlich.

	Anzahl	Senkung	Steigerung
Progesteron	7	6	1
Norgestrel	9	6	3
Ultracorten-H	8	5	3

Es kann hierbei kein signifikanter Unterschied bezüglich einer Veränderung des Thymidineinbaues zwischen Prednisolon und den beiden Gestagenderivaten gefunden werden. Eine Tatsache sei jedoch herausgestellt: In keinem Falle wird eine Steigerung der H^3-Inkorporation gefunden bei Karzinomen des Corpus uteri, wenn diese mit Progesteron oder Norgestrel behandelt worden sind.

f) Enzyme:

Das neu entwickelte Enzym Asparaginase wird in zwei Kon-

zentrationen getestet: 0,2 und 1,0 I.E./ml. Es kann in der Wirkung kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Beide Konzentrationen zeigen in einem Fall bei demselben Tumor einen vermehrten H^3-Einbau. Mit 1,0 I.E./ml kann bei 6 Testen 5mal eine Senkung erreicht werden, während 0,2 I.E./ml in 4 Testen 3mal den H^3-Index vermindern. Die Senkungen sind, wie aus dem Onkobiogramm ersichtlich, beträchtlich und liegen in 3 Fällen unter 30 % der Kontrollmarkierungen.

3. Zellmorphologie und DNS-Synthese.

Die folgende Tabelle faßt noch einmal die oben ausgeführten Ergebnisse zusammen.

Tabelle 8

getestete Substanz	Anzahl der Teste	quantitative Senkung des H^3-Index	quantitative Steigerung des H^3-Index	morpholog. Wirkung	morpholog. Wirkung bei quantitativer Steigerung
Endoxan	15	11	4	5	1
Trenimon	13	12	1	3	1
Thio Tepa	12	10	1	3	
Proresid	15	15	0	13	
Velbe	12	10	2	8	1
VB 74	11	10	1	10	1
VM 26	9	9	0	7	
Methotrexat	11	5	6	0	
Progesteron	7	6	1	3	
Norgestrel	9	6	3	4	1
Ultracorten-H	8	5	3	0	
Asparaginase	10	8	2	5	
Wobe Mugos	6	4	2	0	

alle Werte sind bezogen auf die Kontrolle

In Spalte 4 ist die morphologische Wirkung der jeweilig getesteten Zytostatika auf das Tumorgewebe wiedergegeben. In Spalte 5 sind zusätzlich jene interessanten Fälle aufgeführt, bei denen sich trotz morphologischer Wirkungen eine Steigerung der DNS-Synthese findet, die also bei morphologischer Schädigung einen aktivierten Kernstoffwechsel besitzen.

Auf Grund der oben aufgeführten Tabelle ist die Beziehung zwischen Senkung des H^3-Index und der morphologischen Wirkung durch zytostatische Substanzen zu ersehen. Diese Beziehungen werden im Folgenden diskutiert.

a) Bei fast allen untersuchten zytostatischen Substanzen geht die Senkung des Thymidineinbaues dem morphologischen Schädigungsgrad voraus. Eine Ausnahme bildet das VB 74, bei dem eine direkte Beziehung zwischen der Senkung des H^3-Thymidineinbaues und dem morphologischen Schädigungsgrad gefunden wurde.

b) Die stärksten Senkungen des H^3-Einbaues finden sich bei solchen Kulturen, bei denen eine starke morphologische Schädigung zu sehen ist. Die morphologisch bestimmten Schädigungsgrade sind proportional den im Onkobiogramm angegebenen Senkungen des H^3-Index.

c) Bei 5 Testen zeigen sich deutliche morphologische Schädigungen der Zellen bei einer gesteigerten DNS-Synthese.

d) Ein Vergleich der Alkylantien mit den Podophyllinsäure-

derivaten zeigt bei den alkylierenden Substanzen eine morphologische Wirkung nur in 1/3 bis 1/4 der Fälle, bei den Podophyllinsäurederivaten in 80 bis 90 %. Betrachtet man jedoch die Veränderungen des H^3-Index, so stellt sich heraus, daß die alkylierenden Substanzen eine Senkung in 2/3 bis 3/4 der Fälle zeigen, während bei den Podophyllinsäurederivaten die Senkungen auf ca. 90 bis 95 % ansteigen. Offensichtlich bewirken die Alkylantien Einschränkungen des Kernstoffwechsels, die sich nicht so deutlich in einer morphologischen Schädigung ausdrücken.
Das Verhalten des Vincaalkaloids Velbe liegt zwischen dem der alkylierenden Substanzen und dem der Podophyllinsäurederivaten.

e) Der Folsäureantagonist Methotrexat zeigt bei keiner der untersuchten Kulturen eine Schädigung der Zellen. Es findet sich jedoch in mehr als der Hälfte der untersuchten Fälle eine erhebliche Aktivierung der DNS-Synthese. Der Einbau des tritierten Thymidins steigt bis zu 300 % des Kontrollwertes.

f) Auch die Wirkung von Progesteron, Norgestrel und Ultracorten-H weist, wie die der übrigen zytostatischen Substanzen, eine tumorspezifische Individualität auf. Zwar zeigt sich unter Prednisolon in keinem Fall eine morphologische Schädigung bei den autoradiographischen Untersuchungen; eine Verminderung der DNS-Synthese wird

dennoch in 5 der 8 untersuchten Fälle gefunden. Bemerkenswert erscheint außerdem, daß bei allen Adenokarzinomen des Corpus uteri, bei denen eine morphologische Wirkung unter Norgestrel und Progesteron gefunden wird, eine erhebliche Verminderung der DNS-Synthese eingetreten ist. Sie liegt in allen Fällen unter 50 % der Kontrollmarkierungen.

g) Nach Zusatz von Asparaginase wird, mit einer Ausnahme, bei allen getesteten Konzentrationen eine Senkung des Thymidineinbaues beobachtet. Ein Konzentrationsunterschied bleibt ohne nennenswerten Einfluß auf die DNS-Synthese, im Gegensatz zum morphologischen Test, bei dem sich die meisten Veränderungen bei einer Konzentration von 1,0 I.E./ml zeigen.

4. Besondere Beobachtungen.

Bei einigen der untersuchten Karzinomgewebe findet sich bei einem Teil der markierten Zellen eine völlig unspezifische Markierung (siehe Abbildung 7, 8, 9). Die Silberkorngranula liegen in einem gleichmäßig dicken Ring um den Kern über dem Plasma. Ob es sich hierbei um einen nicht klärbaren Artefakt, die Durchschleusung des Tritium-markierten Thymidins vom Medium zum Kern, um Alters- und Degenerationserscheinungen und damit verbundenen Kernmembranschädigungen der Zellen handelt, kann in diesem Rahmen nicht geklärt werden. Betrachtet man jedoch Abbildung 10,

die aus dem Film "Cancer Chemotherapy-Sensitivity-Test" von LIMBURG und Mitarbeitern (56) stammt, sowie die Abbildungen 11 und 12, so ist eine perlenschnurartige Anordnung der Mitochondrien um den Kern an der Kernmembran zu erkennen. Da Mitochondrien (25, 34, 97) eine mitochondriale DNS besitzen, läßt sich die Frage stellen, ob es hierbei nicht zu einer Markierung von mitochondrialer DNS gekommen ist. Da aber über diesen Mechanismus noch zu wenige Befunde vorliegen, läßt sich keine definitive Aussage über dieses sogenannte Rand- oder Ringphänomen machen.

Abbildung 7: Zelle eines menschlichen Ovarialkarzinoms. Vergr.: 100 x 8 x 1,25

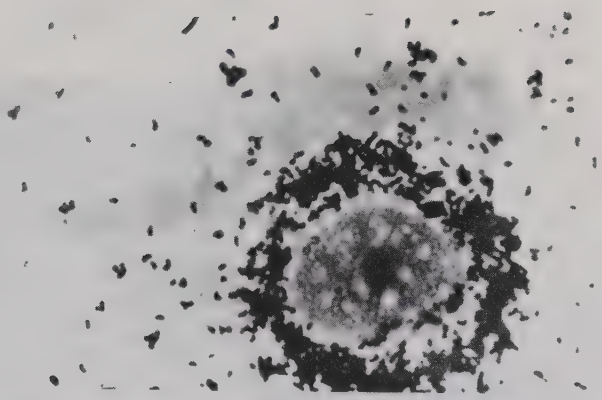


Abbildung 8: Zelle eines menschlichen Ovarialkarzinoms.
Der Nukleolus ist deutlich sichtbar.
Vergr.: 100 x 8 x 1,25

Abbildung 9: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms.
Vergr.: 100 x 8 x 1,25

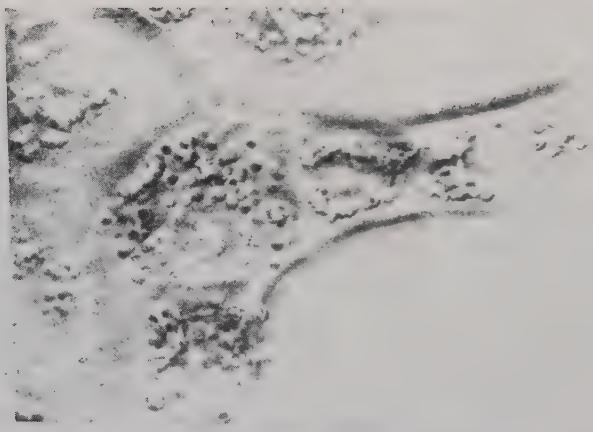


Abbildung 10: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms.
Vergr.: 40 x 8 x 2

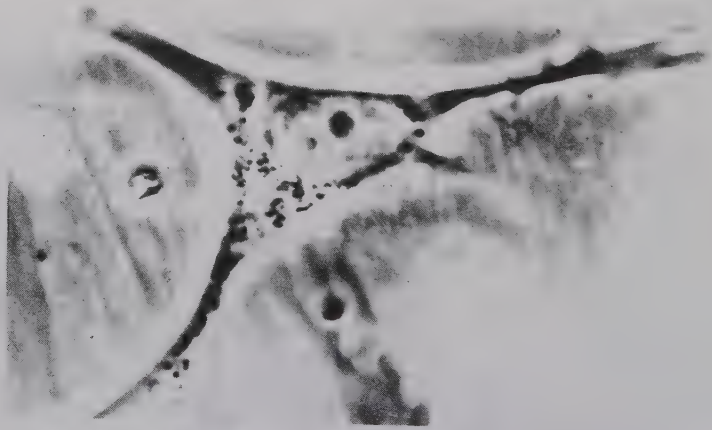


Abbildung 11: Zellen eines menschlichen Portiokarzinoms.
Deutlich sichtbarer Nukleolus.
Vergr.: 40 x 8 x 2

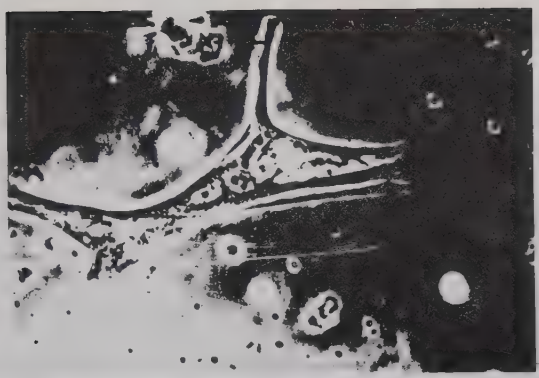


Abbildung 12: Mehrkernige Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms. Deutlich sichtbare Nukleoli.

Vergr.: 40 x 8 x 1,6

III. Diskussion der Ergebnisse

In allen Geweben und Kulturen, die von uns untersucht wurden, gelang der Nachweis von DNS-synthetisierenden Zellen. Damit ist der Beweis für ein echtes Wachstum erbracht. Mitosezählungen, die schon von der Methode her problematisch sind, haben sich zur Erfassung des Wachstumsphänomens in der Gewebekultur nur bedingt bewährt (1, 85). Die Bestimmung des H^3-Index hingegen erfaßt einen weit größeren Teil der proliferierenden Zellpopulation. Durch den Einbau von markiertem Thymidin wird die gesamte DNS-Synthese-Phase, die mindestens 6 bis 8 Stunden dauert, erfaßt, während die eigentliche Mitose nur 30 bis 60 Minuten dauert. Zum Vergleich seien im folgenden noch einmal die Untersuchungsergebnisse anderer Autoren (siehe Tab. 6, Seite 37) mit den eigenen Untersuchungsergebnissen (siehe Tabelle 5, Seite 36) angeführt. Die Tabellen zeigen die Beziehungen zwischen dem H^3-Index und der mittleren Generationszeit der verschiedenen menschlichen Gewebe und Tumoren.

Das am besten untersuchte Objekt zur Bestimmung der Generationszeit ist das menschliche Knochenmark in seinen physiologischen und pathologischen Formen (5, 12, 80). Verschiedenen Autoren war bei Untersuchungen aufgefallen (22, 92), daß bei neoplastisch veränderten Geweben der Anteil der in die DNS-Phase eintretenden Zellen vermindert sei im Vergleich zum normalen Gewebe. Andere Unter-

sucher (17, 51) weisen einen Anstieg des Thymidineinbaues vom normalen Gewebe bis zum Karzinom nach. So fanden FETTIG und SIEVERS (18) einen fast 4fachen Thymidineinbau beim Karzinom der Portio im Verhältnis zum normalen Portiogewebe. Zwischen diesen beiden Ansichten besteht offenbar ein unvereinbarer Gegensatz.

Die meisten Untersuchungen über die Berechnung der mittleren Lebensdauer von normalen und pathologischen Zellen gehen von der Voraussetzung aus, daß die Länge der Synthese-Phase mit annähernder Genauigkeit zwischen 6 und 8 Stunden liegt. Dies konnte durch zahlreiche Untersuchungen zunächst vor allem bei Mäusen und Ratten bestätigt werden (40, 41, 76). Es kann jedoch bei der Kanzerisierung zu einer Änderung der DNS-Synthese-Dauer kommen. So fand CLARKSON (7) beim Ovarialkarzinom eine Dauer der Synthese-Phase von 28 Stunden, beim Endometriumkarzinom von 60 Stunden und beim Magenkarzinom von 30 Stunden. MAURER und Mitarbeiter (68), FLIEDNER und Mitarbeiter (21) sowie KEISER (35) beobachteten eine auf über 20 Stunden verlängerte Synthesedauer bei Leukämiezellen. Außerdem führt eine Polyploidisierung, wie sie bei Karzinomen auftreten kann, zu einer Zunahme der DNS-Synthese-Dauer (50).

Abbildung 13: DNS-synthetisierende Riesenzelle eines menschlichen Portiokarzinoms.

Vergr.: 100 x 8 x 1,6

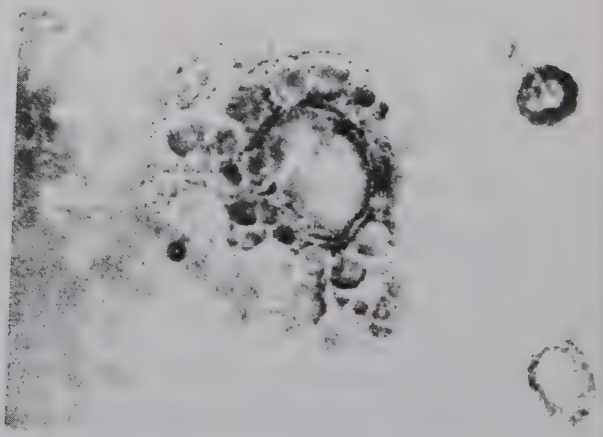


Abbildung 14: Riesenzelle mit Tochterkernen eines menschlichen Ovarialkarzinoms. Man beachte die gedoppelte Kernmembran.

Vergr.: 63 x 8 x 2

Danach waren beim hypertetraploiden Ehrlich-Ascites-Tumor die DNS-Verdopplungszeiten und die Generationsdauer etwa doppelt so lang wie beim diploiden und hyperdiploiden Ehrlich-Ascites-Tumor. Zwar können aus dem pathologischen Verhalten von Tumoren und dem Ploidiegehalt noch keine echten Beziehungen hergestellt werden (57), und auch therapeutisch sind keine Unterschiede festzustellen bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms von verschiedenen Patientinnen mit unterschiedlichem Chromosomenmuster (84). Im Hinblick auf eine selektive Chemotherapie erscheint jedoch der Befund interessant, da verschiedene Substanzen eine Änderung des Thymidineinbaues bewirken.
Diese Verlängerung der Synthesezeit würde bedeuten, daß sich die mittlere Lebensdauer eines Tumors (siehe Tab. 5) noch um mindestens den Faktor 3 erhöhen würde. Es ergäben sich somit unglaublich lange Generationszeiten für einen Tumor. Dabei ist der Zellverlust durch Nekrosen nicht eingerechnet. Auf Grund der angedeuteten Problematik sei noch einmal klar herausgestellt: Die gefundenen Werte für den H^3-Index sind Durchschnittswerte verschiedener Populationen; sie sagen nichts aus über das Verhalten der einzelnen Tumorzelle. Sie sind Integrationswerte aus dem Zellpool der Gesamtkultur.

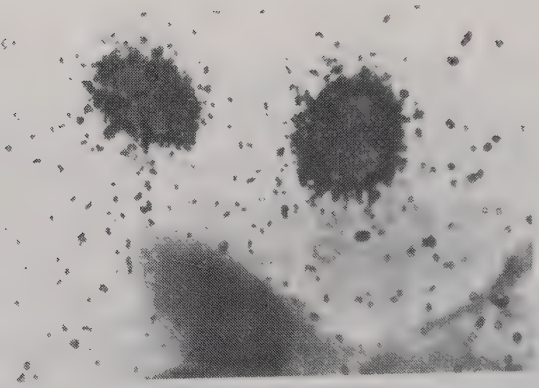


Abbildung 15: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms, die sich in der Synthesephase befinden. Über den Nukleoli fehlt die Markierung!

Vergr.: 100 x 8 x 1,25

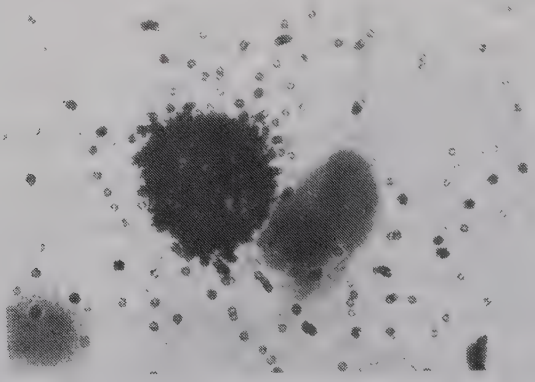


Abbildung 16: DNS-synthetisierende Zelle eines menschlichen Ovarialkarzinoms. Daneben eine Karzinomzelle zum Zeitpunkt der Telophase.

Vergr.: 100 x 8 x 1,25

Betrachtet man die Beeinflussung des Generationszyklus der Tumorzellen durch Zytostatika, so stellt sich die Frage, ob sich Tumorzellen mit unterschiedlicher Proliferationskinetik auch in ihrer Reaktion auf Zytostatika unterschiedlich verhalten. Diese Frage muß sicherlich von Zytostatikum zu Zytostatikum neu gestellt werden, da die Angriffspunkte der einzelnen, wie schon oben erwähnt, verschieden sind. Dennoch zeigt das Onkobiogramm schon bei oberflächlicher Betrachtung, daß die in der Besprechung der Ergebnisse gewählte Einteilung der Zytostatika in Gruppen sich in etwa in der Wirkung wiederspiegelt. D i e s e K o r r e l a t i o n t r i f f t j e d o c h i m m e r n u r f ü r d e n E i n z e l t u m o r z u , i m v o r h e r e i n i s t e b e n s o w i e b e i d e r B e t r a c h t u n g e i n e r m o r p h o l o g i s c h e n W i r k u n g k e i n e A u s s a g e z u m a c h e n.

Nach Zufuhr der alkylierenden Zytostatika Endoxan, das nach vorheriger Rattenleberpassage aktiviert worden ist, Trenimon und Thio Tepa kann bei 40 Einzeltests 34mal eine Erniedrigung des H^3-Thymidineinbaues nachgewiesen werden. Ähnliche Befunde werden von LISS und PALME (60, 61, 63), PALME und Mitarbeitern (74) sowie HÖLZEL und Mitarbeitern (31) erhoben. Bei allen 3 Substanzen geht die DNS-Synthese bis auf 30 % des Kontrollwertes zurück. Damit übereinstimmend haben PALME und LISS (73) schon 1963 bei proliferierenden Systemen der Maus (Kryptenepithelien aus dem Dünndarm) festgestellt, daß eine einmalige Endoxangabe die Zahl der markierten Zellen um

60 % und die mittlere Kornzahl über den Interphasenkernen auf ein Drittel des Kontrollwertes vermindere. Außerdem finden PALME und Mitarbeiter (74) sowie LEHNARTZ und Mitarbeiter (50) eine Verlängerung der DNS-Synthese-Phase nach Zytostatikagabe. So findet LEHNARTZ eine Verlängerung der DNS-Synthese-Zeit von 11 auf 23 Stunden beim diploiden Ehrlich-Ascites-Tumor nach Gabe von Cyclophosphamid in einer Dosierung von 100 mg/kg. Ebenso findet PALME nach Zufuhr von Trenimon beim hyperdiploiden Ehrlich-Ascites-Tumor eine Verlängerung der DNS-Synthese-Zeit um etwa den Faktor 2 (74).

Die Frage nach dem Wirkungsmechanismus der Alkylantien auf die Depression des Thymidineinbaues ist zur Zeit noch im Gange. Die Hemmung der DNS-Synthese durch alkylierende Substanzen ist nicht die primäre Ursache für die Hemmung der Zellvermehrung, denn in vitro-Versuche am Ehrlich-Ascites-Tumor haben gezeigt, daß die für eine direkte Hemmung der DNS-Synthese erforderlichen Dosen wesentlich höher sind, als die für die Hemmung der Zellvermehrung ausreichenden Dosen (62). LISS kann nicht ausschließen, daß die Hemmung des H^3-Thymidineinbaues auch als Ergebnis der primär erfolgten Blockade der Zellteilung auftreten kann. Die an der Teilung gehinderten Zellen gelangen nämlich nicht mehr in die Phase des Generationszyklus, in der die DNS-Synthese stattfindet. Zusätzlich kann nachgewiesen werden, daß es schon zu einer Hemmung der DNS-Synthese kommt, ohne daß eine Senkung des DPN-Gehaltes der Zellen auftritt (63).

Bei 12 Einzeltests mit dem Vincaalkaloid Velbe zeigt sich in 10 Fällen eine Erniedrigung des H^3-Index. Der Einbau geht hier ebenfalls zum Teil auf unter 30 % der unbehandelten Kontrollen zurück. Qualifiziert man die Vincaalkaloide als klassische Mitosegifte, so dürften sie keine direkte Wirkung auf die DNS-Synthese haben. WAGNER (95) berichtet jedoch über eine RNS-Synthese-Hemmung durch Velbe, wobei die Wirkung auf die ribosomale RNS größer sei als auf die transfer-RNS. Der Wirkungsmechanismus scheint ähnlich dem des Colchizins zu sein, wobei vor allem die Zellspindeln angegriffen werden (53). Der Befund anderer Autoren, die unter Velbewirkungen keine Hemmung des Thymidineinbaues finden, kann nicht bestätigt werden; es kann sich hierbei um die Tatsache handeln, daß die Inkubationszeit des Zytostatikums zu kurz gewählt worden ist.

Die Podophyllinsäurederivate Proresid, VB 74 und VM 26 senken bis auf eine Ausnahme, die keine statistische Signifikanz aufweist, den Thymidineinbau zum Teil erheblich.

Bei 35 Einzeltests wird 10mal eine Senkung um über 70 %, 17mal eine Senkung, die zwischen 70 und 40 % liegt, und 7mal eine Verminderung zwischen 40 - 5 % gefunden. In die letzte Gruppe, in der eine relativ geringe Hemmung des Thymidineinbaues eingetreten ist, gehören 4mal Proresid, 1mal VM 26 und 2mal VB 74. Zu der ersten Gruppe, die die stärkste Herabsetzung des Markierungsindex zeigt, sind 4mal

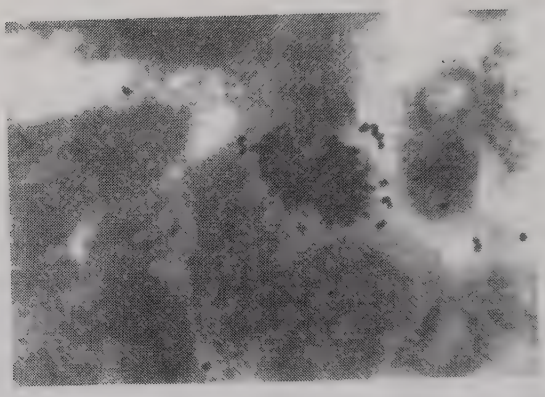


Abbildung 17: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms nach Behandlung mit Endoxan.
Vergr.: 40 x 8 x 2

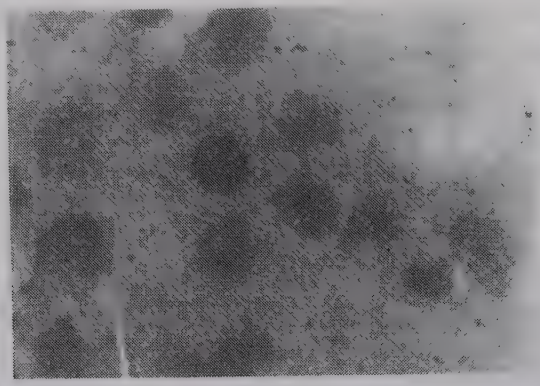


Abbildung 18: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms nach Behandlung mit Proresid. Man beachte die gegen Abb. 17 verminderten Silberkorngranula.
Vergr.: 25 x 8 x 2

Proresid, 4mal VM 26 und 2mal VB 74 vertreten (Tabelle 9).

Tabelle 9: Senkung des H^3-Index durch Podophyllinderivate.

	über 70 %	70 % - 40 %	39 % - 5 %
Proresid	4	7	4
VB 74	2	6	2
VM 26	4	4	1

Es wird keine Übereinstimmung, wie bei den Alkylantien, gefunden hinsichtlich der Wirkung auf das einzelne Gewebe. Es kommt vor, daß VM 26 starke, Proresid mittlere und VB 74 geringe Hemmwirkung auf dasselbe Gewebe haben und umgekehrt. STAMM und STÄHELIN (87) sowie TRANEKJER (91) beobachteten ein deutliches Absinken der Mitoserate von Genitalkarzinomen in vivo und in vitro nach Applikation von Proresid (Tabelle 10).

HECKMANN (28) hat bei Resistenzprüfungen im LDH-Test in 50 % der Fälle bei Proresidwirkung eine Schädigung vorgefunden. Ebenso finden STÄHELIN und CERLETTI (86) eine 50%ige Hemmung der Zellvermehrung bei Proresidzusatz. Auch hierbei scheinen, ähnlich wie bei den Alkylantien und Vincaalkaloiden, viele Mechanismen ineinander zu greifen und es bedarf noch weiterer Untersuchungen, um die in jedem Fall eintretende Hemmung der Thymidininkorporation mit der geringeren Störung des Zellwachstums in Einklang zu bringen.

Tabelle 10: Mitoseraten bei Adenokarzinomen des Corpus uteri nach Zytostatikaeinwirkung (nach A.S. TRANEKJER (91)).

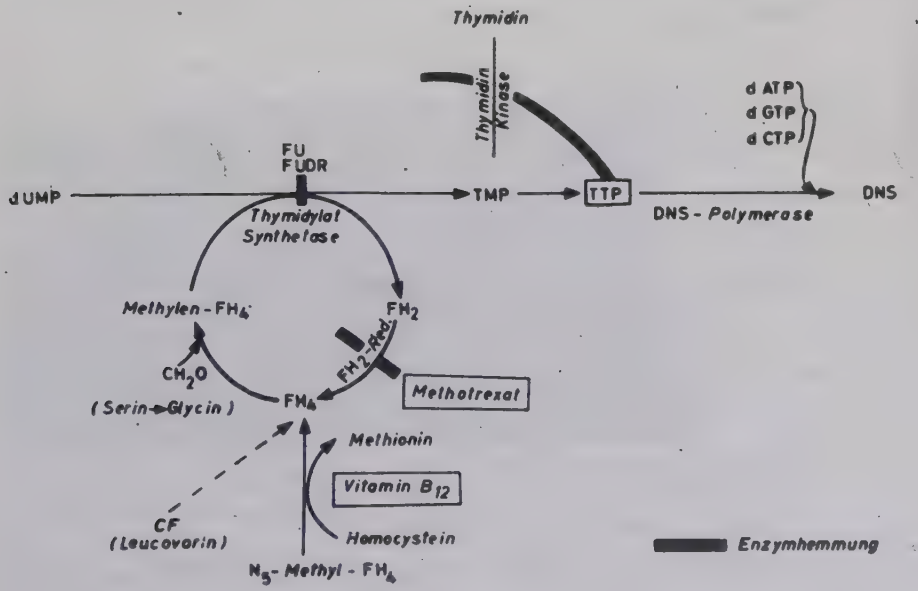
Zytostatikum	Zellen i.d. Interphase	Zellen i.d. Metaphase	Atypische Teilungsformen
Proresid	3.904	2 (0,5%)	23
Endoxan	1.791	3 (1,53%)	36
Prenimon	2.933	5 (1,70%)	-
Kontrolle	6.463	17 (2,55%)	8

Der kritische Grenzwert für das Verhältnis sensibler zu resistenten Zellen liegt bei 1,5 : 1 (30). Ein höherer Quotient macht das Tumorgewebe ansprechbar für Zytostatika. Es ist dann mit einer Schädigung der Zellproliferation zu rechnen. Der Einfluß eines künstlichen Hemmsystems, d.h. eines Zytostatikums, auf die intrazellulären Regulationssysteme des Zellwachstums und der Wachstumsgeschwindigkeit kann sich bemerkbar machen. Wird dieser Quotient unterschritten, liegt morphologisch eine Resistenz vor. Das Vorhandensein von sensiblen Zellen kann sich jedoch noch in einer verschieden starken Herabsetzung des H^3-Index dokumentieren.

Der interessante Befund, daß der Folsäureantagonist Methotrexat eine Steigerung der DNS-Synthese herbeiführen kann

(101), kann bestätigt werden. In mehr als der Hälfte der untersuchten Fälle kommt es zum Teil zu einem hochsignifikanten Anstieg des H^3-Index, bezogen auf die Kontrolle. Im Extremfall liegt die Steigerung um über 300 % des Kontrollwertes. Da ein ähnliches Verhalten auch von 5-Fluoruracil bekannt ist, liegt es nahe, die Ursache aus dem Wirkmechanismus abzuleiten. Diese Substanzen sind Stoffwechselantimetaboliten. Sie wirken durch kompetitive Hemmung. In dem folgenden Schema 3 ist der Wirkort von Methotrexat wiedergegeben.

Schema 3



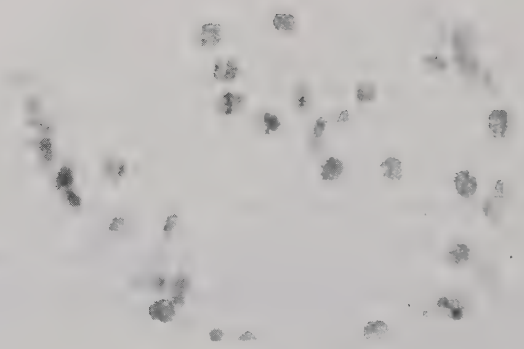


Abbildung 19: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms nach Behandlung mit Methotrexat; man beachte die Markierungsdichte.

Vergr.: 10 x 3 x 1,6

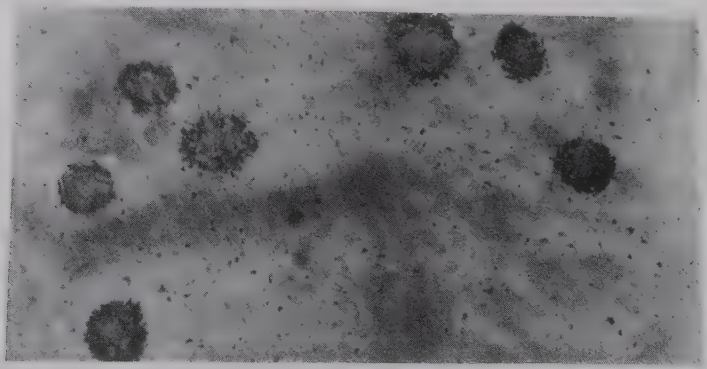


Abbildung 20: Zellen eines menschlichen Ovarialkarzinoms nach Behandlung mit Methotrexat.

Vergr.: 25 x 8 x 2

Methotrexat hemmt kompetitiv das Enzym Dihydrofolatreduktase und drosselt damit die DNS-Synthese. Es bindet sich etwa 20.000mal so fest an die FH_2-Reduktase wie das physiologische Substrat Dihydrofolsäure, wodurch die natürliche Folsäure überspielt wird. Die Zelle besitzt jedoch einen Mechanismus, diesen Vorgang zu kompensieren. Es kommt zu einer starken Produktion des durch den Hemmstoff beeinflußten Enzyms. In unserem Falle wird die Dihydrofolsäurereduktase in erhöhten Mengen synthetisiert (19, 23, 26, 82). Außerdem vermag die FH_2-Reduktase nun ihrerseits Methotrexat fest zu binden (13, 96). Es werden dabei häufig Werte erreicht, die über der Ausgangsbasis liegen (98). Es wäre somit denkbar, daß es durch die Steigerung der Enzymmengen zu einem Ankurbeln der DNS-Synthese kommt, so daß deren Werte über denen der Kontrolle liegen. Diese Phänomene zeigen, daß eine in vitro-Testung von Methotrexat zur Zeit unter den angegebenen Testbedingungen problematisch ist. Dies wird außerdem gestützt durch die Ergebnisse des Krebs-Chemotherapie-Resistenztestes, in dem Methotrexat unter den standardisierten Bedingungen in den seltensten Fällen eine Wirkung zeigt, was häufig im Widerspruch zu der klinischen Effektivität steht. Es wird sicher von großem Interesse sein, diese Frage der in vitro-Wirkung des Methotrexats in weiteren Untersuchungen zu klären.

Über die Wirksamkeit von Progesteronderivaten und Prednisolon auf die Proliferation hormonabhängiger Gewebe liegen

eine Reihe von Untersuchungen vor (KOTTMEIER (42, 43)).

Da allgemein ein direkter Wirkungsmechanismus (29, 69) auf das Karzinomgewebe angenommen werden kann, scheint es interessant, eine quantitative Aussage bezüglich einer Hemmung der DNS-Synthese machen zu können.

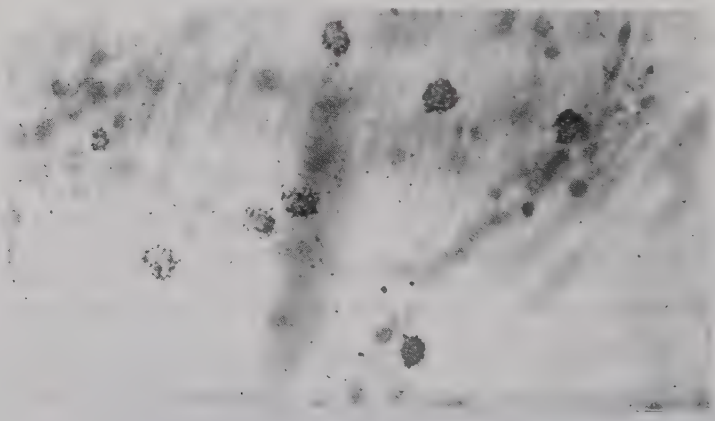


Abbildung 21: Zellen eines menschlichen Korpuskarzinoms nach Behandlung mit Progesteron.
Vergr.: 25 x 8 x 1,25

Der Wirkmechanismus scheint jedoch hierbei noch komplizierter zu sein als bei den klassischen Zytostatika, da neben signifikanten Senkungen der DNS-Synthese auch erhebliche Steigerungen auftreten. Eines wird jedoch klar: Bei hormonabhängigen Geweben wird die Verminderung der DNS-Synthese sowohl von Progesteron als auch Norgestrel hervorgerufen.

Progesteron vermindert die DNS-Syntheseleistung beim Korpuskarzinom bis unter 30 % des Kontrollwertes. Beim Ovarialkarzinom ist die Herabsetzung geringer. Sie geht nur bis etwa 50 %. In einem Fall jedoch kann sogar eine hochsignifikante Senkung der DNS-Synthese eines histologisch anaplastischen Karzinoms durch Norgestrel nachgewiesen werden.
Aus klinischer Sicht ist die Unsicherheit der Hormonanwendung bekannt. MATHIAS (66) weist auf die Beobachtung hin, daß bei Behandlung des histologisch gleichen Tumors bei verschiedenen Patientinnen sowohl Hemmung als auch Stimulation des Tumorwachstums hervorgerufen werden kann. Auch er fordert eine individuelle in vitro-Testung über die Wirksamkeit eines Hormonpräparates auf das Tumorwachstum.
In den beiden folgenden Tabellen ist noch einmal die direkte Wirkung von Progesteron, Norgestrel und Prednisolon auf hormonabhängige Gewebe in der Kultur zusammengefaßt.
Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse des Resistenztestes in der Gewebekultur.
Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse autoradiographisch untersuchter Kulturen.

Tabelle 11 (nach A.S. TRANEKJER)

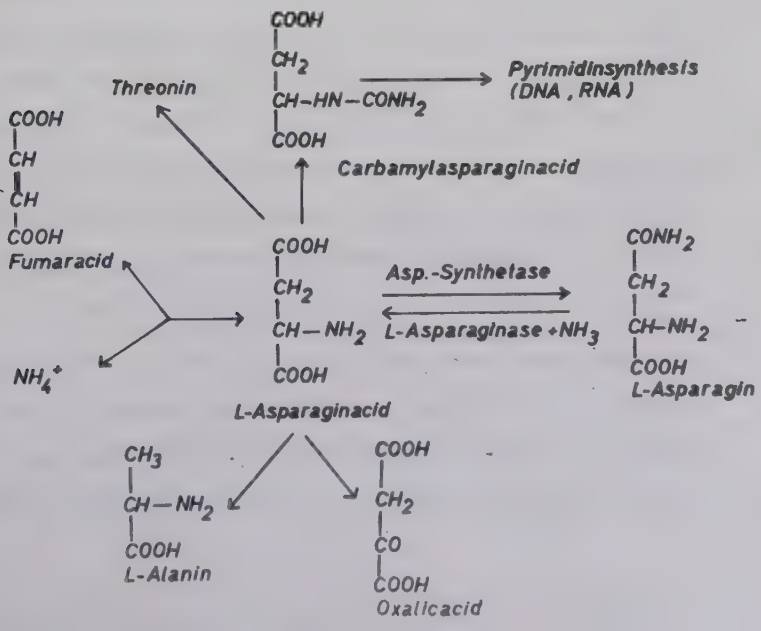
Gewebeart	Anzahl der Gewebe	Norhydroxy-progesteron keine Wirkung	Norhydroxy-progesteron zytostat. Wirkung	Norgestrel keine Wirkung	Norgestrel zytost. Effekt	Prednisolon keine Wirkung	Prednisolon zytost. Effekt
gutartige Tumoren	15	7	3	1	2	8	1
Korpuskarzinome	28	22	10	3	7	13	3
Ovarialkarzinome	17	12	6	2	4	12	2
Ovarialsarkome	3	2	0	1	1	2	0
Ovarialkarzinome							
a) Ascites	18	11	9	4	1	8	5
b) Pleuraerguß	7	5	2	1	1	5	1
Metastasen von gynkol. Karzinomen	7	3	1	-	-	6	0
Zervixkarzinome	10	3	2	0	1	7	0
selten getestetes Krebsgewebe	11	3	4	0	4	8	1
Hypernephrome	11	5	6	-	-	8	3
Summe	127	73	43	12	21	78	16
		63 %	37 %	36 %	64 %	83 %	17 %

Tabelle 12: Senkung des H^3-Index durch Gestagene und Cortisonderivate.

	über 70%	70% - 40%	39% - 5%	keine Senkung
Progesteron	2	3	1	1
Norgestrel	2	4	0	3
Ultracorten-H	0	4	1	3
Summe	4	11	2	7

Das neu in die Therapie von Malignomen eingeführte Enzym Asparaginase kann ebenfalls in seiner Wirkung auf DNS-Synthese untersucht werden.

Schema 4



Asparaginase wirkt im Stoffwechsel durch die Spaltung der Carbonamidgruppierung von L-Asparagin und überführt L-Asparagin in L-Asparaginsäure. Die bisher einzig bekannte Funktion des L-Asparagin ist die, in Proteine eingebaut zu werden (4). Da einige Malignomzellen nicht über genügend Asparaginsynthetase verfügen, kann durch Injektion von Asparaginase der Bestand von L-Asparagin abgebaut werden. Die Zellen sterben nach kurzer Zeit an Mangelerscheinungen. Dieser Stoffwechseldefekt ist nicht obligat, und auch hierbei ist eine in vitro-Vortestung zu empfehlen (78, 83). Es hat sich jedoch erwiesen, daß die Ergebnisse einer in vitro-Vortestung von Leukämiezellen nicht in jedem Fall mit der in vivo-Empfindlichkeit korrespondieren. Ein Ansprechen der Zellen in vitro braucht kein Ansprechen des Patienten auf L-Asparaginase zu bedeuten und umgekehrt kann bei Nichtansprechen in vitro eine Empfindlichkeit in vivo bei Leukämien gegeben sein. Bei soliden Tumoren liegen zur Zeit noch zu wenige Beobachtungen vor. Einzelbeobachtungen deuten jedoch ähnliche Verhältnisse an. Dies dürfte allerdings auf bis jetzt noch ungeklärte metabolische Vorgänge hinweisen. Die Aussagekraft einer direkten Wirkungstestung wird hiervon nicht betroffen.

Asparaginase führt bei sensiblen Geweben in 3 Fällen zur Senkung des H^3-Index unter 30 % des Kontrollwertes, in 2 Fällen liegt die Verminderung zwischen 30 und 60 %. Bei einem Ovarialkarzinom tritt eine Steigerung der DNS-Synthese

auf. Dieses Karzinom ist jedoch gegen alle Zytostatika mit Ausnahme von VM 26 und Proresid resistent.

Schema V

	morphol. Wirkung	H^3-Index	(Kontrolle = 0,44 %)
Endoxan	neg.	0,48 %	
Trenimon	neg.	0,52 %	
Thio-Tepa	neg.	0,64 %	
Proresid	+	0,40 %	
VM 26	++	0,16 %	
Methotrexat	neg.	0,76 %	
Progesteron	neg.	0,60 %	
Ultracorten-H	neg.	0,76 %	
Asparaginase 0,2 I.E.	neg.	0,68 %	
Asparaginase 1,0 I.E.	neg.	0,56 %	

Beispiel für einen Resistenztest bei gleichzeitiger Angabe des H^3-Index. Das Karzinom ist gegen alle getesteten Substanzen außer Proresid und VM 26 resistent.

Abbildung 22: Tumorzellen eines Ovarialkarzinoms nach Einwirkung von Asparaginase. Man erkennt deutlich geschädigte Zellen neben intakten Zellen und einer sich in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Zelle. Die Silberkornzahl ist relativ gering!
Vergr.: 40 x 8 x 2

C. Zusammenfassung

An Primärexplantaten benigner und maligner menschlicher Tumoren wird autoradiographisch der H^3-Index bestimmt. Dabei wird eine direkte Beziehung zwischen Reifungsgrad der untersuchten Tumoren und Thymidineinbau gefunden. Der Nachweis von DNS-synthetisierenden Zellen ist ein Beweis für ein echtes Wachstum der ausgepflanzten Tumorzellen. Die gefundenen H^3-Indizes sind Integrationswerte aus dem Gesamtpool der ausgepflanzten heterogenen Zellpopulation. Eine Aussage über das Verhalten von Einzelzellen ist nicht möglich. Ein Rückschluß auf die Proliferationsaktivität der Gesamtkultur ist jedoch erlaubt.
In weiteren Untersuchungen wird die Beeinflußbarkeit der Proliferationsaktivität von Karzinomgeweben durch Zytostatika untersucht. Als proliferationskinetisches Maß dient hierbei der H^3-Index. Die Veränderungen des H^3-Index, hervorgerufen durch die Inkubation einzelner Zytostatika, erlauben einen Einblick in Frühveränderungen des Kernstoffwechsels der Malignomzellen, die der morphologischen Schädigung zeitlich vorausgehen. Beide Methoden zusammen genommen - morphologische Betrachtung der Gesamtkultur und Messung des H^3-Index als Kriterium für den Kernstoffwechsel - erlauben eine präzise Aussage über die Resistenzlage von menschlichen Karzinomgeweben in vitro. Untere Untersuchun-

gen bestätigen im wesentlichen die Ergebnisse des Krebs-Chemotherapie-Resistenztestes. Für das Enzym Asparaginase und den Folsäure-Antagonisten Methotrexat werden die kritischen Punkte ihrer in vitro-Testung aufgezeigt. Auf Grund der bis heute vorliegenden Ergebnisse erscheint eine Korrelation für diese beiden Substanzen von in vitro- und in vivo-Bedingungen nicht erlaubt. Die Arbeitsfähigkeit des Krebs-Chemotherapie-Resistenztestes wird durch die proliferationskinetischen Untersuchungen bestätigt.

D. Literaturverzeichnis

1. AHRENS, C.A.; PRINZ, G.: Mitosen beim präinvasiven und invasiven Plattenepithel-Carcinom der Portio.
Arch. Gynäk. 187: 305-318 (1955)

2. BASERGA, R.; HENEGAR, G.C.; KISIELESKI, W.E.; LISCO, H.: Uptake of tritiated thymidine by human tumours in vivo.
Lab. Invest. 11: 360-364 (1962)

3. BASRUR, P.K.; BASRUR, V.R.; GILMAN, J.P.W.: Method for the preparation of autoradiographs with coverslip cultures.
Nature 212: 424-425 (1966)

4. BAUER, K.: Zur Biochemie der Asparaginase.
Med. Klinik 64: 9-12 (1969)

5. BOND, V.P.; FLIEDNER, T.M.; CRONKITE, E.P.; RUBINI, J.R.; BRECHER, G.; SCHORK, P.K.: Proliferative potentials of bone marrow and blood cells studied by in vitro uptake of H^3-thymidine.
Acta haemat. 21: 1-15 (1959)

6. CYONÉ, B.; FRISCHBIER, H.J.: In vivo-Untersuchungen mit H^3-Thymidin zum Studium der Tumorzellkinetik in Punktaten; in:
MEYER, H. und J. BECKER: Strahlenforschung und Strahlenbehandlung, Bd. 4, 156-165
München-Berlin 1963.

7. CLARKSON, B.; OTA, K.; OHKITA, T.; O'CONNOR, A.: Kinetics of proliferation of cancer cells in neoplastic effusions in man.
Cancer 18: 1189-1213 (1965)

8. COLE, J.W.; McKALEN, A.: Observations of cell renewal in human rectal mucosa in vivo with thymidine-H^3.
Gastroenterol. 41: 122-125 (1961)

9. COONS, H.; NORMAN, A.; NAHUM, A.: In vitro-measurments of human tumor growth.
Cancer 19: 1200-1204 (1966)

10. CRONKITE, E.P.; BOND, V.P.; FLIEDNER, T.M.; KILLMANN, S.A.
The use of tritiated thymidine in the study of haemopoitiec cell proliferation.
Ciba Found Symp. on Haemopoiesis, ed. by Wolstenholme, G.E.W. and O'Connor, N.;
S. 70-92, Little Brown & Co., 1960.

11. CRONKITE, E.P.; FLIEDNER, T.M.; BOND, V.P.; RUBINI, J.R.: Dynamic of haemopoietic proliferation in man and mice studied by H^3-thymidine incorporation in to DNA.
J. clin. Invest. 37: 887-893 (1958)

12. CRONKITE, E.P.; BOND, V.P.; FLIEDNER, T.M.; RUBINI, J.R.: The use of tritiated thymidine in the study of DNA synthesis and cell turnover in hemopoietic tissues.
Lab. Invest. 8: 263-275 (1959)

13. DELMONTE, L.; JUKES, T.H.: Folic acid antagonists in cancer chemotherapy.
Pharmakol. Rev. 14: 91-125 (1962)

14. DULBECCO, R.; VOGT, M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.
J. exp. Med. 99: 167-182 (1954)

15. EIDINOFF, M.L.; FITZGERALD, P.J.; SIMMEL, E.B.; KNOLL, J.E.: Intracellular localization of compounds labeled with tritium,H^3, by autoradiography.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 77: 225-229 (1951)

16. FETTIG, O.: H^3-Index-Bestimmungen und Berechnungen der mittleren Generationszeit (Lebensdauer) der Einzelabschnitte des gesunden und krankhaften Endometriums nach autoradiographischen Untersuchungen mit H^3-Thymidin.
Arch. Gynäk. 200: [illegible] (1965)

17. FETTIG, O.; OEHLERT, W.: Autoradiographische Untersuchungen der DNS- und Eiweißneubildung im gynäkologischen Untersuchungsmaterial.
Arch. Gynäk. 199: 649-662 (1964)

18. FETTIG, O.; SIEVERS, R.: H^3-Index und mittlere Generationszeit des menschlichen Portiokarzinoms und seiner Vorstufen.
Beitr. path. Anat. 133: 87-100 (1966)

19. FISCHER, G.A.: Increased levels of folic acid reductase as a mechanism of resistance to amethopterin in leucemic cells.
Biochem. Pharmakol. 7: 75-77 (1961)

20. FITZGERALD, P.J.; EIDINOFF, M.L.; KNOLL, J.E.; SIMMEL, E.
Tritium in radioautography.
Science 114: 494-495 (1951)

21. FLIEDNER, T.M.; CRONKITE, E.P.; ROBERTSON, J.S.: Granulocytopoiesis. I. Senescence and random loss of neutrophilic granulocytes in human beeings.
Blood 24: 402-409 (1964)

22. FLIEDNER, T.M.; FRISCHBIER, H.J.: Der H^3-Thymidin-Test zur Bestimmung der Vermehrungsgeschwindigkeit leukämischer und neoplastischer Zellen.
Vortrag am 16.12.1959 vor dem Naturhistorisch-Medizinischen Verein, Heidelberg.

23. FRIEDKIN, M.; CRAWFORD, E.; HUMPHREYS, S.R.; GOLDIN, A.: The association of increased dihydrofolate reductase with amethopterin resistance in mouse leukemia.
Cancer Res. 22: 600-606 (1962)

24. GROSS, J.; BOGOROCH, R.; NADLER, N.J.; LEBLOND, L.P.: The theory and methods of the radioautographic localization of radioelements in tissues.
Amer. J. Roentgenol. 65: 420-458 (1951)

25. GRUNDMANN, E.: Über intracelluläre Vorgänge während der Karzinogenese.
Münch. Med. Wschr. 108: 1662-1667 (1966)

26. HAKALA, M.T.; ZAKRZEWSKI, S.F.; NICHAL, C.A.: Relation of folic acid reductase to amethopterin resistance in cultured mammalian cells.
J. Biol. Chem. 236: 952-958 (1961)

27. HARBERS, E.; NEUMANN, K.-H.: Autoradiographie als histochemische Methodik.
Klin. Wschr. 32: 337-342 (1954)

28. HECKMANN, U.: Quantitative enzymatische Verfahren zur Resistenztestung benigner und maligner Gewebe gegen Zytostatika in der Gewebekultur.
Med. Welt (N.F.) 19: 743-746 (1968)

29. HECKMANN, U.: Zur Wirkung des Norhydroxyprogesteroncapronat auf das Adenocarcinoma corporis uteri in der Gewebekultur.
Dtsch. med. Wschr. 90: 2328-2330 (1965)

30. HECKMANN, U.; TRANEKJER, A.S.; HARMS, J.: Probleme der Resistenzbildung bei der cytostatischen Behandlung von Karzinomen.
Zbl. Gynäk. 91: 1204-1210 (1969)

31. HÖLZEL, F.; WULFMEYER, E.; SCHWENCKE, J.; MAASS, H.: Die Hemmung von Nukleinsäuresynthese und Transplantierbarkeit bei Ehrlich-Ascites-Tumorzellen durch Natulan, Trenimon und P-Benzochinon.
Ztschr. Krebsforschg. 70: 95-108 (1967)

32. JOHNSON, H.; BOND, V.P.: A method of labeling tissues with tritiated thymidine in vitro and its use in comparing rates of cell proliferation in Duct. epithelium, fibroadenoma and carcinoma of human breast.
Cancer 14: 639-643 (1961)

33. JOHNSON, H.; RUBINI, J.R.; CRONKITE, E.P.; BOND, V.P.: Labeling of human tumor cells in vivo by tritiated thymidine.
Lab. Invest. 9: 460-465 (1960)

34. KARLSON, P.: Biochemie; Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, S. 280-232

35. KEISER, G.: Cytokinetic studies in a monocytic leukemia. 2nd meet. Europ. Study Group. for Cell Proliferation 1968

36. KILLMANN, S.A.: Proliferative acitivity of blast cells in leukemia and myelofibrosis. Acta med. Scand. 178: 263-280 (1965)

37. KILLMANN, S.A.; CRONKITE, E.P.; FLIEDNER, T.M.; BOND, V.P Cell proliferation in multiple myeloma studied with tritiated thymidine in vivo. Lab. Invest. 11: 845-853 (1962)

38. KILLMANN, S.A.; CRONKITE, E.P.; ROBERTSON, J.S.; FLIEDNER T.M.; BOND, V.P.: Estimation of phases of the life cycle of leukemic cells from labeling in human beeings in vivo with tritiated thymidine. Lab. Invest. 12: 671-684 (1963)

39. KISSEL, P.; DUPREZ, A.; BESSOT, M.; SCHMITT, J.; DOLLANDE A.: Autoradiography in vivo of human cancers. Nature 210: 274-276 (1966)

40. KOBURG, E.; MAURER, W.: Autoradiographische Untersuchunge mit H^3-Thymidin über die Dauer der DNS-Syn these und ihren zeitlichen Verlauf bei der

Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus.
Biochim. Biophys. Acta 61: 229-242 (1962)

41. KOBURG, E.; SCHULTZE, B.: Autoradiographische Untersuchungen mit H^3-Thymidin über die Dauer der DNS-Synthese, der Ruhephase und der Mitose bei proliferierenden Systemen wie den Epithelien des Darmes, des Ösophagus und der Cornea der Maus.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 45: 103-107 (1961)

42. KOTTMEIER, H.L.: Bull. Féder. int. Obstét. Gynéc. 3: 208 (1965)

43. KOTTMEIER, H.L.: Krebsdokumentation und Statistik maligner Tumoren.
Schattauer Verlag, Stuttgart 1966.

44. KRÜGER, H.: Stoffwechsel und Molekularbiologie der Tumoren.
Dtsch. Krebskongreß, Berlin 1968

45. KÜNKEL, H.A.: Zur Frage der Strahlenbelastung des Zellkernes durch Incorporation von H^3-Thymidin.
Strahlentherap. 118: 46-53 (1962)

46. LAITHA, L.G.: In: STAHLMAN, F., Jr.: The kinetics of cellular proliferation, S. 173-182
Greene & Stratton, New York-London 1959

47. LAITHA, L.G.; OLIVER, R.; ELLIS, F.: Incorporation of ^{32}P and adenine ^{14}C into DNA by human bone marrow cells in vitro.
Brit. J. Cancer 8: 367-379 (1954)

48. LALA, P.K.; MALONEY, M.A.; PATT, H.M.: Measurement of DNS-synthesis time in myeloid-erythroid precursors.
Experim. Cell. 38: 626-634 (1965)

49. LENNARTZ, K.J.: Proliferationskinetik von Tumorzellen.
Dtsch. Krebskongreß, Berlin 1968

50. LENNARTZ, K.J.; MAURER, W.; EDER, M.: Autoradiographische Untersuchungen über die Dauer der DNS-Verdoppelung und die Generationszeit bei Aszitestumoren (Maus) mit unterschiedlicher Chromosomen-Stammlinien und von verschiedener Abstammung.
Ztschr. Krebsforschg. 71: 267-282 (1968)

51. LESCH, R.; SCHLESSLE, W.; OEHLERT, W.: Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese an menschlichem Exzisionsmaterial aus dem Bronchialbaum.
Beitr. Path. Anat. 129: 296-306 (1963)

52. LETTRÉ, H.: Problem der Regulation bei der Krebskrankheit.
Mat. Med. Nordmark XIX/10: 553-565 (1967)

53. LETTRÉ, H.: Zellstudien mit Vinka-Alkaloiden in vivo und in vitro.
Int. Symp. ü. d. Anwendung d. Vinca-Alkaloide "Velbe" und Vincristen";, S. 137-140
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien 1969

54. LETTRÉ, R.: Schematische Darstellung der Bestimmung der einzelnen Phasen des Zellzyklus bei Zugabe markierten Thymidins.
Mat. Med. Nordmark XX/11: 645-650 (1968)

55. LIMBURG, H.: Die Frühdiagnose des Uteruskarzinoms.
Thieme Verlag, Stuttgart 1956

56. LIMBURG, H.; HECKMANN, U.; TRANEKJER, A.S.; HAMANN, A.: Film: "The Cancer Chemotherapy Sensitivity Test 1969".

57. LIMBURG, H.; HECKMANN, U.; Zur Resistenzbildung von Tumorzellen im Krebs-Chemotherapie-Resistenztest
Krebsforschg. Krebsbekämpfg. VI: 170-175, Urban & Schwarzenberg, Berlin-München-Wien 1967

58. LIMBURG, H.; KRAHE, M.: Die Züchtung von menschlichem Karzinomgewebe in der Gewebekultur und seine Sensibilitätstestung gegen neuere Zytostatika.
Dtsch. med. Wschr. 89: 1938-1943 (1964)

59. LIPKIN, M.; BELL, B.M.; SHERLOCK, P.: Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. I. Cell renewal in colon and rectum.
J. clin. Invest. 42: 767-776 (1963)

60. LISS, E.; PALME, G.: DPN-Gehalt, anaerobe Glykolyse und DNS-Synthese von Ascitestumorzellen unter dem Einfluß von Trenimon.
Krebswiss. 50: 672-673 (1963)

61. LISS, E.; PALME, G.: Die Hemmung des Einbaues von ^{32}P in die DNS durch Endoxan.
Naturwiss. 50: 336-337 (1963)

62. LISS, E.; PALME, G.: Beziehungen zwischen Beeinflussung von DNS-Synthese und Hemmung der Zellvermehrung durch alkylierende Substanzen.
Dtsch. Krebskongreß, Berlin 1968

63. LISS, E.; PALME, G.: Der Einfluß von ylkylierenden Zytostatika auf den Nukleinsäurestoffwechsel von EAT.
Ztschr. Krebsforschg. 66: 196-206 (1964)

64. LISS, E.; PALME, G.; OEFF, K.: In vivo-Versuche über die Wirkung des Trenimons.
Ztschr. Krebsforschg. 71: 89-97 (1968)

65. LOCHAYA-VIMOKESANT, S.; WINCHELL, H.S.; FISH, M.B.; POLLYCORE, M.: Decreased de novo DNA-thymine synthesis and increased thymidine-H^3-incorporation into DNA by human bone marrow cultured with aminopterin.
Proc. Soc. Exper. Biol. 126: 621-624 (1967)

66. MATTHIES, J.Q.: Advances in the chemotherapy of malignant disease.
The Practit. 201: 646-651 (1968)

68. MAURER, A.M.: Characteristics of cell proliferation in a patient with acute leukemia.
Lancet II: 675-676 (1964)

69. MAURER, A.M.; LAMPKIN, B.C.; SAUNDERS, E.F.: Kinetics of leucemic cells.
XIth Congr. Int. Soc. Haematol., S. 42, Sydney, 1966

69. MEISSNER, J.; HANSEN, H.G.; WULF, U.: Zum Wirkungsmechanismus des Kortisons auf den Nukleinsäurestoffwechsel.
Radionuklide klin. Onkol. 3: 105-110 (1964

70. MITTERMEYER, Ch.: Der mitotische Zyklus und seine Beeinflussung durch Zytostatika.
Dtsch. Krebskongreß, Berlin 1968

71. ODEBLAD, E.: Artefacts in autoradiography.
Acta Radiol. Stockholm 39: 192-204 (1953)

72. OEHLERT, W.; DÖRMER, P.; LESCH, R.: Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese im überlebenden Tumorgewebe des Menschen.
Beitr. Path. Anat. 128: 468-480 (1963)

73. PALME, G.; LISS, E.: Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß von Cyclophosphamid (Endoxan) auf die DNS-Synthese proliferierender Zellsysteme der Maus.
Klin. Wschr. 41: 291-292 (1963)

74. PALME, G.; LISS, E.; OEFF, K.: Die Proliferationskinetik von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen unter der Einwirkung alkylierender Zytostatika.
5. Int. Kongr. f. Chemotherapie, Wien; Abstracta, S. 183-186 (1967), A IV 1a/16

75. PELC, S.R.; WELTON, M.: Quantitative evaluation of tritium in autoradiography and biochemistry.
Nature 216: 925-927 (1967)

76. PILGRIM, Ch.; MAURER, W.: Autoradiographische Bestimmungen der DNS-Verdoppelungszeit verschiedener Zellarten von Maus und Ratte bei Doppelmarkierungen mit H^3- und C^{14}-Thymidin.
Naturwiss. 49: 544-545 (1962)

77. POWSNER, E.: On the use of thymidine H^3 in tissue culture.
Int. J. Appl. Rad. Isotopes 18: 206-207 (1967)

78. PRAGER, M.; BACHYNSKY, N.: Asparagine synthetase in normal and malignant tissues; correlation with tumor sensitivity to asparaginase.
Arch. Biochem. Biophys. 127: 645-654 (196

79. RAJEWSKY, M.F.: Thymidin-Inkorporation und O_2-Konzentration in Explantaten normaler und maligner Gewebe "in vitro".
Naturwiss. 52: 341-342 (1965)

80. RUBINI, J.R.; In vitro DNA labeling of bone marrow and leukemic blood leukocytes with tritiated thymidine. H^3-thymidine biochemistry in vitro.
J. Lab. Clin. Med. 68: 566-576 (1966)

81. RUBINI, J.R.; CRONKITE, E.P.; BOND, V.P.; FLIEDNER, T.M. HUGHES, W.L.: Metabolism of tritiated thymidine in man.
Clin. Res. 6: 267 (1958)

82. SARTORELLI, A.C.; BOOTH, B.A.; BERTINO, J.R.: Folate metabolism in methotrexate-sensitive and -resistant Ehrlich ascites cells.
Arch. Biochem. Biophys. 103: 53-59 (1964)

83. SCHMIDT, C.G.; GALLMEIER, W.M.: Zur Enzymtherapie der Leukämie.
Dtsch. med. Wschr. 93: 2299-2309 (1968)

84. SLOT, E.: Die Chromosomenzahl in der Stamm-Zellinie des Ovarialkarzinoms und ihre Beziehung zum therapeutischen Ergebnis durch Chemotherapie.
Zbl. Gynäk. 90: 210-213 (1968)

85. SMITH, C.L.; DENDY, P.P.: Relation between mitotic index, duration of mitosis, generation time and fraction of deviding cells in a cell population.
Nature 193: 555-556 (1962)

86. STÄHELIN, H.; CERLETTI, A.: Experimentelle Ergebnisse mit den Podophyllum-Cytostatika SPI/SPG.
Schweiz. med. Wschr. 94: 1490-1502 (1964)

87. STAMM, O.; STÄHELIN, H.: Klinisch-experimentelle Prüfung der Wirksamkeit von Podophyllinderivaten auf Genital-Carcinome mittels Mitosetest.
Exp. und klin. Erfahrungen mit Podophyllinderivaten i. d. Tumortherapie; 2. Rothenburger Gespräch 1966, S. 87-94;
Schattauer Verlag, Stuttgart

88. STELL, G.G.: Cell loss as a factor in the growth rate of human tumours.
Europ. J. Cancer 3: 381-386 (1967)

89. THEML, H.; TREPEL, F.; RASTETTER, J.; BEGEMANN, H.: DNS- und RNS-Synthese in benignen und malignen Lymphomen.
Klin. Wschr. 45: 609-618 (1967)

90. TITUS, J.L.; SHORTER, R.G.: Labeling of human tumors with tritiated thymidine.
Arch. Path. 79: 325-328 (1965)

91. TRANEKJER, A.S.: Über die Wirkung verschiedener Zytostatika auf die Mitoserate von Malignomen des weiblichen Genitales in vitro.
5. Int. Kongr. Chemotherap., Wien; Abstracta B 9/5: 205-209 (1967)

92. TREPEL, F.: Tumorzellproliferation. Theorie und Ergebnisse.
Med. Klin. 63: 656-661 (1968)

93. TREPEL, F.; RASTETTER, J.; THEML, H.; STOCKHUSEN, G.: Nucleinsäuresynthese und Zytostatikawirkung in pathologischen Lymphknotenzellen.
Med. Klin. 61: 618-622 (1966)

94. TURKINGTON, R.W.: Cation inhibition of DNA-synthesis in mammary epithelial cells in vitro. Experientia 24: 226-228 (1968)

95. WAGNER, E.K.; ROIZMAN, B.: Effect of the vinca alkaloids on RNA-synthesis in human cells in vitro. Science 162: 569-570 (1968)

96. WERKHEISER, W.C.: The relation of folic acid reductase to aminopterin toxicity. J. Pharmacol. exp. Ther. 137: 167-172 (1962)

97. WERTH, G.: Zur Organisation und chemischen Leistung der Zelle. Med. Welt 20: (N.F.) 946-954 (1969)

98. WILMANS, W.: Kompetitive Enzymmechanismen bei der Therapie von Hämoblastosen mit Antimetaboliten. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 1968; S. 822-830, Bergmann-Verlag, München

99. WITTE, S.: Die Chemotherapie bei malignen Tumoren. Internist 9: 365-375 (1968)

100. WOLBERG, W.H.; BROWN, R.R.: Autoradiographic studies of in vitro incorporation of uridine and thymidine by human tumor tissue.
Cancer Res. 22: 1113-1119 (1962)

101. WÜST, G.P.; MATTHES, K.H.: Einbau von H^3-Thymidin in exstirpierte Tumorstückchen unter Einwirkung von Zytostatika.
Dtsch. Krebskongreß, Berlin 1968

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr.med. H. G. Limburg, Direktor der Univ.-Frauenklinik Homburg-Saar, für die freundliche Überlassung des Themas recht herzlich bedanken.

Herrn Chefarzt Priv.-Doz. Dr.med. U. Heckmann bin ich für die verständnisvolle Einführung in das Arbeitsgebiet sehr verbunden.

Der besondere Dank gilt Herrn Oberarzt Dr.med. A.S. Tranekjer, der mir bei der theoretischen Problematik eine große Hilfe war und der die Durchsicht des Textes übernahm.

Für ihre unermüdliche Hilfe bei den experimentellen Untersuchungen danke ich Fräulein Anke Hamann.

Herrn Diplom-Mathematiker O. Spaniol danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Untersuchungsergebnisse.

Lebenslauf

Am 11. Februar 1945 wurde ich, Andreas Karl-Jürgen Brachetti als Sohn des Dr.med. Andreas Brachetti und seiner Ehefrau Pauline, geb. Michel, in Gettenau/Kr. Büdingen geboren.

Ostern 1951 trat ich in die Volksschule in Kloster Arnsburg ein. Vom Herbst 1951 bis zum Herbst 1955 besuchte ich die Volksschule in Homburg/Saar. Ab Herbst 1955 bis zum Frühjahr 1964 war ich Schüler des Staatlichen Humanistischen Gymnasiums in St. Wendel/Saar, an dem ich im Februar 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Sommersemester des gleichen Jahres immatrikulierte ich mich an der Universität des Saarlandes, an der ich auch im Sommer 1965 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ablegte. Im Frühjahr 1967 legte ich die ärztliche Vorprüfung ab. Während des Sommersemesters 1967 studierte ich an der Universität Graz (Österreich). Seit dem Herbst 1967 studiere ich wieder an der Universität des Saarlandes, an der ich zum Frühjahrstermin 1970 mein Staatsexamen abzulegen gedenke.

Homburg, den 3. September 1969